UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de formulações de uso tópico a base de insulina no
distúrbio das glândulas lacrimais e na regeneração da córnea em
ratos diabéticos

Estael Luzia Coelho Madeira da Cruz

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de formulações de uso tópico a base de insulina no
distúrbio das glândulas lacrimais e na regeneração da córnea em
ratos diabéticos

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos
e Cosméticos.

Orientada: Estael Luzia Coelho
Madeira da Cruz

Orientadora: Prof^a Dr^a Renata
Fonseca Vianna Lopez

Ribeirão Preto
2014

CRUZ, E.L.C.M.	Avaliação de formulações de uso tópico a base de insulina no distúrbio das glândulas lacrimais e na regeneração da córnea em ratos diabéticos	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCFRP/USP 2014
-------------------	---	---	---------------------------------------

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

CRUZ, Estael Luzia Coelho Madeira

Avaliação de formulações de uso tópico a base de insulina no distúrbio das glândulas lacrimais e na regeneração da córnea em ratos diabéticos. Ribeirão Preto, 2014.

125p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Renata Fonseca Vianna Lopez

1. Insulina. 2. Micropartícula. 3. Gel termorreversível. 4. Síndrome do olho seco. 5. Lesões na córnea

FOLHA DE APROVAÇÃO

Estael Luzia Coelho Madeira da Cruz

Avaliação de formulações de uso tópico a base de insulina no distúrbio das glândulas lacrimais e na regeneração da córnea em ratos diabéticos

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos
e Cosméticos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Renata Fonseca
Vianna Lopez

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial aos meus amados pais Mafalda e Jadiel por serem meus alicerces, exemplo de amor, dedicação e trabalho. À minha irmã Yasmim, avó Alaide e Tia Matilde, pelo carinho e admiração. Ao Maurílio meu companheiro de todas as horas, que sempre confiou em mim, não permitindo que eu desistisse. De perto ou de longe com certeza fizeram a diferença, amo muito todos vocês. À Profª Drª Renata Lopez, que acreditou que tudo era possível.

AGRADECIMENTO

À Universidade de São Paulo e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por fornecerem todo o suporte necessário para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha e toda a equipe da “Casa 19” pela atenção despendida e os ensinamentos repassados.

Ao Prof. Dr. Luís Alexandre Pedro de Freitas, pelo empréstimo do *Spray Dryer* e ao técnico Luiz Henrique Cenzi, pelo carinho e auxílio no preparo das micropartículas.

À Profª Drª Glória Emília Petto de Souza, pelo empréstimo do criostato e à técnica Míriam Cristina Contin de Melo, pela ajuda com os cortes histológicos.

À Profª Drª Maria Vitória Lopes Badra Bentley, pelo empréstimo do difratômetro e ao técnico José Orestes Del Ciampo pelo auxílio nas leituras.

Aos amigos do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: Ronaldo de Araújo, Reinaldo Fernando Batista e Antônio Flávio Marongio, pela receptividade e ajuda com os animais.

Aos técnicos: Tadeu, Carlinhos e Daniel, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que me acolheram com carinho, me auxiliando nos experimentos *in vivo*.

Aos meus queridos amigos de laboratório: Karina Dias, Tatiana Pereira, Lucas Huber, Danielle Ramos e Camila Cubabayachi, pela paciência e alegria do convívio. E, em especial ao Joel Souza pela confiança e sabedoria e a Daniela Bernardi pelo apoio, amizade e carinho, em todas as horas. Vocês foram muito importantes nesta etapa da minha vida.

À Patrícia Sper Simão pelo auxílio, carinho e compreensão. Sempre disposta a ajudar, não medindo esforços.

Ao Maurílio pela paciência, companheirismo e dedicação. Sempre presente e disposto a ajudar no que for preciso, tornando cada etapa menos dolorida. Essa vitória também é sua.

À minha família e amigos que compreenderam a distância e permaneceram sempre ao meu lado. Dando-me forças para continuar a caminhada.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi e Rosana Florêncio, pela colaboração e trabalhos prestados.

À Profª Drª Regina Célia Garcia de Andrade e toda a Comissão de Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por permitirem a conclusão desta pesquisa.

À Tais Nader Chrysostomo Massaro pela alegria, amizade e compreensão. Auxiliando-me em diversos momentos.

Em especial à minha orientadora, Profª Drª Renata Fonseca Vianna Lopez, exemplo não somente de uma exímia profissional, mas uma excelente pessoa. Com quem tive o imenso prazer de conviver durante esses anos. “*Teacher*” muito obrigada por acreditar que tudo era possível, obrigada pelos ensinamentos, carinho e amizade. Você é um exemplo a ser seguido.

**“Não sobrecarregues os teus dias
com preocupações desnecessárias,
a fim de que não percas a
oportunidade de viver com alegria.”**

André Luiz

RESUMO

CRUZ, E.L.C.M. **Avaliação de formulações de uso tópico a base de insulina no distúrbio das glândulas lacrimais e na regeneração da córnea em ratos diabéticos.** 2014. 125f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Distúrbios na superfície da córnea e nas glândulas lacrimais acometem com frequência os indivíduos com *diabetes mellitus*. Atualmente não existe tratamento seguro e eficaz para feridas na córnea e o tratamento da síndrome do olho seco (SOS) é predominantemente sintomático. A administração tópica da insulina (INS) é uma estratégia promissora para tratar esses distúrbios, devido à presença de seus receptores na superfície ocular e na glândula lacrimal, e aos seus efeitos metabólicos e mitogênicos. No entanto, os fármacos aplicados topicamente na forma de solução são rapidamente drenados do olho, resultando em uma baixa biodisponibilidade local. O objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações contendo INS e avaliar a sua influência no distúrbio das glândulas lacrimais e na regeneração da córnea em ratos diabéticos. Foram desenvolvidas quatro formulações contendo 1 UI/mL de INS: dispersão contendo insulina (DISP INS), dispersão contendo micropartículas quitosana/INS (DISP MP INS), gel termorreversível *in situ* com INS (Gel INS) e Gel contendo as micropartículas quitosana/INS (Gel MP INS). Também foram produzidas formulações “brancas”, sem a veiculação do fármaco: dispersão contendo micropartículas sem insulina (DISP MP s/INS); gel termorreversível *in situ* sem insulina (Gel s/INS). As MP incorporadas nas formulações foram preparadas por *spray drying* e apresentaram tamanho de $4,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$, morfologia adequada e grande quantidade de INS ($77 \pm 6\%$). Todas as formulações apresentaram pH e osmolalidade compatíveis com o uso ocular. Durante o estudo *in vivo*, foi realizado o tratamento diário (15 dias) dos animais diabéticos, com as formulações (50 μL) em ambos os olhos, exceto nos controles positivo (sem diabetes) e controle negativo (diabético não tratado). Todos os animais tratados com INS aumentaram a produção de fluido lacrimal, sendo que, ao término do tratamento, não foi observada diferença estatística entre o controle positivo e aqueles tratados com DISP INS e com Gel MP INS. A INS foi detectada na glândula lacrimal e no globo ocular dos animais tratados com DISP MP INS, Gel INS e Gel MP INS, sendo que a maior concentração de INS foi encontrada nos ratos tratados com Gel MP INS. Ao término do tratamento houve redução da glicemia dos animais tratados com a INS, o que pode sugerir um tratamento coadjuvante em pacientes diabéticos. Estudos de citologia de impressão mostraram que o Gel INS e Gel MP INS foram capazes de aumentar o número de células do epitélio da córnea e melhorar a relação núcleo/citoplasma em relação ao controle negativo. A histologia do globo ocular mostrou que essas duas formulações também melhoraram a espessura do epitélio da córnea, que foi semelhante a dos controles positivos. Conclui-se que a incorporação da INS nos géis e nas micropartículas desenvolvidas desempenhou um efeito positivo no tratamento da síndrome do olho seco e de lesões na córnea.

Palavras-chave: Insulina; Micropartículas; Gel termorreversível *in situ*; Síndrome do olho seco; Lesões na Córnea.

ABSTRACT

CRUZ, E.L.C.M. **Evaluation of topical formulations based insulin disorder of lacrimal glands and in the regeneration of the cornea in diabetic rats.** 2014. 125f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Disorders in the corneal surface and the lachrymal glands often affect individuals with diabetes mellitus. Nowadays there is no safe and effective treatment for wounds in the cornea and the treatment of dry eye syndrome (DES) is primarily symptomatic. Topical administration of insulin (INS) is a promising strategy for treating these disorders due to the presence of receptors on the ocular surface and lacrimal gland, besides its metabolic and mitogenic effects. However, the drugs applied topically in the form of a solution are quickly drained from the eye, resulting in a low local bioavailability. The aim of this study was to develop formulations containing INS and evaluate their influence on disorders of lacrimal glands and cornea healing in diabetic rats. Four formulations containing 1 IU/mL of INS were developed: dispersion containing insulin (DISP INS), dispersion containing chitosan microparticles/INS (DISP MP INS), *in situ* forming gel containing INS (Gel INS) and *in situ* forming gel containing microparticles chitosan/INS (Gel MP INS). "White" formulations were also produced without the drug: dispersion containing microparticles without insulin and *in situ* forming gel without insulin. MP incorporated in the formulations were prepared by spray drying and showed size of $4.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$, proper morphology and high INS load ($77 \pm 6\%$). All formulations exhibited pH and osmolarity compatible with the ocular use. *In vivo* studies were performed using diabetic rats that were treated daily (15 days) with instillation of the formulations (50 μL) in both eyes, except in the positive controls (health rats) and negative control (untreated diabetic rats). All animals treated with INS showed an increase in the production of tear fluid. After treatment, no statistical difference was observed between the positive control and those treated with DISP INS and Gel MP INS. The INS was detected in the lacrimal gland of the animals treated with DISP MP INS, Gel INS and Gel MP INS, with the highest concentration of INS found in mice treated with Gel MP INS. After treatment there was a reduction in blood glucose of the animals treated with formulations containing INS, which suggests that developed formulations may be used as an adjuvant treatment in diabetic patients. Impression cytology studies showed that the Gel INS and Gel MP INS were able to increase the number of the corneal epithelium cells and improve nucleus/cytoplasm ratio compared to the negative control. The histology of the eyeball showed that these two formulations have improved the thickness of the corneal epithelium, which was similar to the positive controls. In conclusion, incorporation of INS in the gels and MP developed induced a positive effect in the treatment of dry eye syndrome and corneal wound.

Keywords: Insulin; Microparticles; *In situ* forming gel; Dry eye syndrome; Corneal wound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do globo ocular, estrutura e anexos	3
Figura 2. Anatomia detalhada do olho humano	5
Figura 3. Histologia da córnea de rato, demonstrando as camadas do epitélio (EP), estroma (ST) e endotélio (ED)	6
Figura 4. Representação esquemática do fluido lacrimal pré-corneal	10
Figura 5. Representação esquemática da molécula de insulina	22
Figura 6. Estrutura tridimensional da molécula de insulina. A) monômero; B) dímero; C) hexâmero	24
Figura 7. Estrutura química da quitosana em baixo pH	30
Figura 8. Representação esquemática dos grupos de animais utilizados nos experimento <i>in vivo</i>	39
Figura 9. Distribuição do diâmetro das micropartículas por difração de raio laser. A) micropartícula sem insulina; B) micropartícula com insulina	49
Figura 10. Fotomicrografia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A e B) cristais de insulina humana recombinante; C e D) micropartícula sem insulina; E e F) micropartícula com insulina	50
Figura 11. Representação gráfica da curva analítica da insulina, na faixa de concentração de 11,7 à 337 $\mu\text{UI/mL}$	55
Figura 12. Glicemia capilar dos animais dois dias após a indução do <i>diabetes mellitus</i>	57
Figura 13. Animais diabéticos que apresentaram opacidade do cristalino	58
Figura 14. Variação do peso dos animais utilizados durante o estudo <i>in vivo</i> , em três tempos: antes da indução do DM (1ª semana), antes do início do tratamento (8ª semana) e no término do tratamento (10ª semana)	61
Figura 15. Variação da glicemia capilar nos animais em três tempos: antes do DM, início do tratamento (Dia 0) e no término do tratamento (Dia 15)	62
Figura 16. Fluido lacrimal produzido antes do início do tratamento, Dia 0, pelos animais não diabéticos, saudáveis, em relação aos animais diabéticos, doentes	64
Figura 17. Fluido lacrimal recuperado dos olhos dos animais tratados em	

função do tempo	65
Figura 18. Localização da glândula lacrimal em ratos	67
Figura 19. Peso da glândula lacrimal dos animais não diabéticos, em relação aos animais diabéticos	67
Figura 20. Dosagem da insulina na glândula lacrimal dos animais após o término do tratamento	68
Figura 21. Dosagem da insulina no globo ocular dos animais após o término do tratamento	71
Figura 22. Dosagem da insulina na circulação sanguínea dos animais após o término do tratamento	72
Figura 23. Análise por citologia de impressão da superfície ocular dos animais ao término do tratamento, Dia 15	74
Figura 25. Fotomicrografia contendo a mensuração da espessura do epitélio da córnea, em μm	76
Figura 26. Espessura do epitélio da córnea, em μm	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Osmolalidade dos géis e da solução de quitosana, com pH 6,0, pelo método direto	53
Tabela 2 – Peso corpóreo, em g, apresentado pelos animais, antes da indução do DM, antes do início do tratamento e ao término do tratamento	60
Tabela 3 – Fluido lacrimal, em mm, recuperado dos olhos dos animais durante o experimento <i>in vivo</i> , medidos pelo teste do fenol vermelho, em função do tempo de tratamento	64
Tabela 4 – Espessura do epitélio da córnea, expressos em média e desvio padrão, em μm , de todos os animais utilizados no experimento <i>in vivo</i> , após o sacrifício	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM	<i>Diabetes mellitus</i>
SOS	Síndrome do olho seco
IGF-1R	Fator de crescimento ligado à insulina
DEWS	<i>Dry Eye Workshop</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal
IL-1	Interleucina 1
HGF	Fator de crescimento hepatócito
AGEs	Produtos de glicação avançada
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear – $\kappa\beta$
TNF- α	Fator de necrose tecidual - α
PPAR- γ	Proliferadores de peroxissomo - γ
PPV	<i>Vitrectomia pars plana</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
UI	Unidade Internacional
pI	Ponto isoelétrico
UV	Ultravioleta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
INS	Insulina
R%	Rendimento do processo
INS%	Concentração de insulina presente no pó resultante
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
ICH	<i>International Conference of Harmonisation</i>
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
DISP	Dispersão
STZ	Estreptozotocina
RPT	Teste do fenol vermelho
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Tampão fosfato salino
pKa	Constante de dissociação acídica

CV	Coeficiente de variação
Ag-Ac	Antígeno-Anticorpo
°C	Graus Celsius

LISTA DE SÍMBOLOS

©	Copyright
κ	Kappa
β	Beta
α	alfa
γ	gama
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	li
Lista de Figuras	lii
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas e Siglas	vii
Lista de Símbolos	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Estrutura do globo ocular humano	3
2.1.1. Anatomia ocular	3
2.1.2. Estruturas que compõe o segmento anterior do globo ocular e as suas funções	4
2.2. Doenças associadas ao segmento anterior do olho	12
2.2.1. Síndrome do olho seco	12
2.2.2. Lesões no epitélio corneano	14
2.2.3. <i>Diabetes mellitus</i> e as alterações na superfície ocular	16
2.3. Tratamento da síndrome do olho seco e lesões na córnea	19
2.4. Insulina - estrutura e aplicação ocular	22
2.5. Administração ocular de fármacos	25
2.5.1. Micropartículas	28
2.5.2. Gel termorreversível	31
3. OBJETIVO	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Metas	33
4. METODOLOGIA ENVOLVIDA	33
4.1. Método analítico para a quantificação da insulina	33
4.2. Obtenção das micropartículas de quitosana contendo insulina pela técnica do <i>spray drying</i>	34
4.2.1. Caracterização das micropartículas de quitosana/insulina	35
4.2.1.1. Rendimento do processo de produção (R%)	35
4.2.1.2. Quantidade de insulina livre presente no pó resultante (INS%)	35
4.2.1.3. Tamanho das partículas	36
4.2.1.4. Morfologia	36
4.2.1.5. Potencial zeta	36
4.3. Obtenção do sistema geleificante <i>in situ</i> de quitosana e poloxamer contendo insulina	36
4.3.1. Caracterização do gel termorreversível <i>in situ</i>	37
4.3.1.1. Osmolalidade e pH	37
4.3.1.2. Potencial zeta	37
4.4. Obtenção do sistema geleificante <i>in situ</i> de quitosana e poloxamer contendo as micropartículas	38
4.5. Formulações avaliadas no estudo <i>in vivo</i>	38
4.6. Estudos <i>in vivo</i> com as preparações a base de insulina para o tratamento da síndrome do olho seco e lesões na córnea	39
4.6.1. Indução do <i>diabetes mellitus</i>	40
4.6.2. Tratamento com as formulações	40

4.6.3. Variação de peso corpóreo e glicemia capilar	40
4.6.4. Análise da secreção de lágrimas – teste do fenol vermelho	40
4.6.5. Citologia de impressão da córnea	41
4.6.6. Dosagem da insulina na circulação sanguínea	43
4.6.7. Recuperação da insulina na glândula lacrimal e no globo ocular	43
4.6.8. Análise da espessura do epitélio corneano	43
4.7. Análise estatística	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Formulações tópicas contendo insulina	45
5.1.1. Dispersão contendo insulina	45
5.1.2. Micropartículas de quitosana/insulina	46
5.1.3. Sistema geleificante <i>in situ</i> de quitosana e poloxamer contendo insulina	52
5.2. Quantificação da insulina por ELISA	55
5.3. Estudos <i>in vivo</i> com as formulações a base de insulina para o tratamento da síndrome do olho seco e lesões na córnea	57
5.3.1. Indução do <i>diabetes mellitus</i>	57
5.3.2. Tratamento com as formulações contendo insulina	58
5.3.3. Variação de peso corpóreo e glicemia capilar	59
5.3.4. Produção de fluido lacrimal (teste fenol vermelho)	63
5.3.5. Recuperação da insulina na glândula lacrimal	66
5.3.6. Recuperação da insulina no globo ocular	70
5.3.7. Dosagem da insulina no sangue periférico	72
5.3.8. Análise citológica da superfície ocular	73
5.3.9. Espessura da córnea	75
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM), juntamente com o envelhecimento, é provavelmente o principal fator de risco responsável por doenças no globo ocular (MOSS et al., 2000 + MOSS et al., 2004). Além das complicações bem conhecidas causadas por ele, como a catarata e a retinopatia diabética, sua relação com as alterações na superfície ocular e com os distúrbios no funcionamento das glândulas lacrimais tem sido muito discutida nos últimos anos (RAMOS-REMUS et al., 1994; GOEBBELS, 2000; DOGRU et al., 2001; KAISERMAN et al., 2005; ALVES et al., 2008). Sabe-se que o DM prejudica a secreção lacrimal e induz mudanças na glândula lacrimal e na superfície ocular, como observado em estudos experimentais e clínicos (ALVES et al., 2005 ; WAKUTA et al., 2007). No entanto, o mecanismo pelo qual essas alterações ocorrem ainda não está bem compreendido (AZAR et al., 1992; NEPP et al., 2000).

De acordo com Ishida et al. (1984), Rocha et al. (2000), Peponis et al. (2002) e Alves et al. (2005), a hiperglicemia crônica, o estresse oxidativo causado por ela, as alterações nervosas e os distúrbios na ação da insulina desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento dessas alterações na superfície ocular. Esses eventos contribuem para o dano tecidual e podem criar um ambiente inflamatório, com uma resposta não-específica, que aumenta e perpetua a lesão no tecido, tanto na superfície da córnea, retardando ou impedindo a sua cicatrização, como na glândula lacrimal, levando a síndrome do olho seco (SOS) (ALVES et al., 2008).

Apesar dos problemas relacionados à cicatrização de lesões na córnea serem considerados um dos distúrbios oculares de maior frequência mundial, representando a terceira maior causa de cegueira no mundo (TANDON et al., 2010), e da alta prevalência da síndrome do olho seco nos últimos anos, em torno de 5% à 33% dependendo da população em estudo (MILJANOVIC et al., 2007; LEMP, 2008). Não existe, atualmente, tratamento seguro e eficaz para a cicatrização da córnea (TANDON et al., 2010) e o tratamento para o olho seco é predominantemente sintomático (FONSECA et al., 2010).

Neste contexto, a descoberta da existência de receptores de insulina e da própria insulina na superfície ocular e na glândula lacrimal (FINI, 1999; ROCHA et al., 2000; ROCHA et al., 2002; KLENKLER e SHEARDOWN, 2004; CUNHA et al., 2005; ALVES et al., 2008; MODULO et al., 2009; YU et al., 2010; ABDELKADER et

al., 2011) apontam para uma possível participação deste hormônio no combate e/ou retardo das alterações ou doenças que acometem a superfície do globo ocular. De fato, a insulina tem sido alvo constante de pesquisas envolvendo a promoção da cicatrização da córnea (ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2005; ZAGON et al., 2006; CUNHA et al., 2007; ZAGON et al., 2007; ALVES et al., 2008; YU et al., 2010; BASTION e LING, 2013; HAMPEL et al., 2013) e, também, mostrou ser promissora na prevenção de lesões na glândula lacrimal (MODULO et al., 2009).

A insulina exerce importantes efeitos metabólicos e mitogênicos sobre diversos tecidos alvos. Ela influencia no afluxo de nutrientes, armazenamento de energia, expressão gênica, síntese de proteínas e sinalização de mediadores intracelulares (ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2007; ALVES et al., 2008). Seu papel no controle metabólico e suas vias de sinalização, que regem a mitose e a proliferação do tecido, são relevantes para a homeostase da córnea (MODULO et al., 2009). Estudo recente realizado por Modulo et al. (2009) com ratos diabéticos verificou que a aplicação subcutânea de baixas doses de insulina, além de induzir a mitose e a proliferação celular, relevantes para a promoção da cicatrização da córnea, foi capaz de retardar o surgimento de algumas modificações bioquímicas e estruturais presentes nas glândulas lacrimais dos animais.

No entanto, sabe-se que a administração subcutânea é invasiva e não localizada, pouco conveniente para os pacientes, além de causar dor, ferimentos e fobia de agulhas. Desta forma, o desenvolvimento de formulações destinadas à aplicação tópica da insulina, localizada na superfície do olho, pode evitar os problemas relacionados à administração injetável invasiva e trazer benefícios tanto para o tratamento de lesões na córnea como para a síndrome do olho seco. Porém, a maior parte dos fármacos aplicados topicamente é drenada do olho através de vários mecanismos, como a lacrimação, a diluição do fármaco pela lágrima e a renovação da lágrima, resultando numa baixa biodisponibilidade dos mesmos (GAUDANA *et al.*, 2009). A biodisponibilidade local da insulina pode ser aumentada com a administração de formulações que aumentem seu tempo de residência na superfície do olho, bem como facilitem sua penetração nas glândulas lacrimais e nas células da córnea. Sendo assim, este trabalho propõe desenvolver essas formulações e avaliar seu efeito na melhora dos sintomas da síndrome do olho seco e na cicatrização de lesões na córnea.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estrutura do globo ocular humano

2.1.1. Anatomia ocular

Responsável por proporcionar o sentido da visão, o globo ocular humano é formado por um complexo sistema ótico, capaz de detectar a luz e transformar essa percepção em impulsos elétricos a serem processados e interpretados no cérebro (GEORGIEV, 2011). Protegido pelas pálpebras e células de gordura, está situado dentro de uma cavidade óssea denominada órbita. A órbita aloja também outras estruturas do tecido mole e anexos oculares, como os músculos e as glândulas (LUDWIG, 2005) (Figura 1).

Figura 1: Anatomia do globo ocular, estrutura e anexos (Adaptado de Visual Art:© 2013 The University of Texas MD Anderson Cancer Center).

O globo ocular possui, na idade adulta, aproximadamente 24 mm de diâmetro anteroposterior e 12 mm de largura, formando uma esfera ligeiramente assimétrica (LUDWIG, 2005). Essas dimensões são praticamente constantes, variando apenas um ou dois milímetros entre diferentes indivíduos. Anatomicamente, o globo ocular pode ser dividido em duas porções, o segmento anterior e o posterior. O segmento anterior do olho é formado pelo cristalino, corpo ciliar, câmara anterior e posterior,

íris e córnea, enquanto o segmento posterior inclui o corpo vítreo, a retina e a coroide (OGURA, 2001). No presente trabalho daremos ênfase às estruturas pertencentes ao segmento anterior do olho, objeto de estudo, que serão descritas detalhadamente a seguir.

2.1.2. Estruturas que compõe o segmento anterior do globo ocular e as suas funções

O segmento anterior do olho é delimitado internamente pelo cristalino, também conhecido como lente. Trata-se de um disco biconvexo, transparente, constituído por numerosas camadas de fibras proteicas e elásticas, que focam os raios de luz na retina (McCAA, 1982). Anatomicamente, está situado entre a câmara posterior e o humor vítreo, e é mantido na posição correta por um conjunto de fibras orientadas radialmente, denominado zônula ciliar, as quais se inserem de um lado na cápsula do cristalino e do outro no corpo ciliar (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). O formato do cristalino está diretamente relacionado com a visão de objetos a pequenas e grandes distâncias. Para visualizar objetos a mais de seis metros os ligamentos suspensores tracionam a região equatorial do cristalino, causando um achatamento anteroposterior da lente, o que diminui a refração dos raios. Já para objetos mais próximos, observa-se a redução da tração sofrida pelos ligamentos suspensores, devido à contração dos músculos ciliares do corpo ciliar, fazendo com que o cristalino assuma uma forma mais esférica (LEITE et al., 2013).

Além da sustentação e acomodação do cristalino, o corpo ciliar também é responsável pela produção do humor aquoso no segmento anterior do bulbo do olho (MACRI e CEVARIO, 1975). O humor aquoso é um líquido transparente, basicamente um ultrafiltrado do sangue, que preenche tanto a câmara posterior, situada entre o cristalino e a íris, quanto a câmara anterior, entre a íris e a córnea (EITHER et al., 2004). Sua taxa de produção e absorção é suficientemente elevada para repor o volume total das câmaras e manter a pressão intra-ocular constante (McCAA, 1982). O humor aquoso além de ajudar na manutenção da forma do globo ocular é responsável pelo fornecimento de oxigênio e nutrientes ao cristalino e à córnea (MACRI e CEVARIO, 1975; JARVINEN et al., 1995).

Entre o cristalino e a córnea, e dividindo a câmara na porção anterior e posterior, tem-se a íris, porção colorida do olho. Sua principal função é o controle da

entrada de luz, o que é realizado através de um orifício central denominado pupila. É a pupila que permite a comunicação da câmara posterior com a anterior e que muda de tamanho de acordo com a variação da intensidade da luz ambiente, contraindo sob luz forte e dilatando sob luz fraca (EITHER et al., 2004) (Figura 2). E, por último, compondo o segmento anterior do olho mais externamente, tem-se a córnea, cuja estrutura e função serão detalhados a seguir.

Figura 2: Anatomia detalhada do olho humano (Adaptado de Visual Medical Center©).

CÓRNEA

A córnea é uma estrutura transparente e avascular que está exposta diretamente ao meio externo. Suas principais funções são refratar a luz e proteger as estruturas oculares internas mantendo assim, a integridade física do olho (KLAUSNER et al., 2007). É considerada o elemento refrativo primário do sistema visual, contribuindo com 70 a 80% do poder de refração total do olho (KONRADE et al., 2012). Sua curvatura e transparência são elementos essenciais para a

passagem de luz para a retina e, portanto, para manter a visão (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001).

Anatomicamente, a face anterior da córnea é elíptica e mede, no indivíduo adulto, aproximadamente 12,6 mm, na horizontal e 11,7 mm, na vertical. Possui uma espessura variável no centro e na periferia, de 520 μm e 650 μm , respectivamente. Sua curvatura não é uniforme, sendo mais curva na região central, com um raio de 7,8 mm e mais plana na região periférica, com raio de curvatura de 6,6 mm (BROWN et al., 2006).

Histologicamente a córnea é constituída por cinco camadas, da mais interna para mais externa são, respectivamente: endotélio, membrana de Descemet, estroma, membrana de Bowman e epitélio; com estruturas e propriedades bem diferenciadas entre si (MUCCIOLI, et al., 2006; KLAUSNER et al., 2007) (Figura 3).

Figura 3: Histologia da córnea de rato, demonstrando as camadas do epitélio (EP), estroma (ST) e endotélio (ED). Lâmina corada com Hematoxilina-eosina, aumento de 40 x, animal diabético tratado com gel termorreversível *in situ* contendo insulina, obtida durante o presente estudo.

ENDOTÉLIO

O endotélio é a camada mais interna da córnea, constituído por uma camada única de células hexagonais, com cerca de 5 μm de altura e 20 μm de largura, em formato de mosaico. Esta camada é responsável por manter o grau de desidratação constante das demais camadas da córnea, essencial para a manutenção da transparência corneana (GRASS e ROBINSON, 1988). O que só é possível devido a

ação das bombas de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (RODRIGUES et al., 2006; PIGATTO et al., 2008; HOFFMAN et al., 2009) e anidrase carbônica, que removem a água da córnea a uma velocidade de $6,5 \mu\text{L}/\text{cm}/\text{h}$ (GRASS e ROBINSON, 1988). A nutrição do endotélio é realizada pelo humor aquoso que fornece oxigênio e glicose, possivelmente por transferência facilitada (JARVINEN et al., 1995).

As células endoteliais possuem baixa (RODRIGUES et al., 2006) ou nenhuma capacidade de regeneração e replicação (PATEL e McGHEE, 2005). Esta característica causa, ao longo dos anos, a diminuição da população celular local, assim como a redução de sua espessura. Uma vez que as células endoteliais não realizam mitose, quando há algum tipo de lesão, as estruturas remanescentes aumentam de tamanho (polimegatismo) e/ou alteram a sua forma (pleomorfismo) com o intuito de preencher a área lesionada (AGRAWAL e TSAI, 2003; KLAUSNER et al., 2007). De acordo com Mishima (1982), a falência progressiva do tecido endotelial pode provocar o edema da córnea, com perda localizada de sua transparência e o comprometimento da acuidade visual. Algumas doenças oculares de alta prevalência, como o glaucoma, uveítes, traumas oculares e ceratocone, são capazes de alterar a morfologia desta camada, comprometendo a sua função (FRANZEN et al., 2010).

MEMBRANA DE DESCOMET

Acima do endotélio tem-se a membrana de Descemet. Estrutura acelular composta por colágeno e glicoproteínas que são continuamente sintetizadas e excretadas pelo endotélio. Possui uma espessura variável com a idade, aumentando ao longo da vida, sendo de $3 \mu\text{m}$ nos recém nascidos e $8\text{-}10 \mu\text{m}$ nos adultos. Esta membrana é muito resistente, podendo permanecer intacta mesmo em casos graves de ulceração corneal (PATEL e McGHEE, 2005).

ESTROMA

O estroma corresponde a, aproximadamente, 90% da espessura total da córnea (cerca de $450 \mu\text{m}$) e está localizado acima da membrana de Descemet (NAGAYASU et al., 2009). É basicamente composto por fibras colágenas e uma matriz extracelular de proteoglicanas, com uma estrutura altamente organizada. A

disposição regular das fibras colágenas nesta camada está diretamente relacionada à manutenção da transparência da córnea (PATEL e McGHEE, 2005). O estroma possui baixa densidade de células, correspondendo a menos de 3% da sua composição (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001), das quais destacam-se os queratinócitos. Quando há uma lesão, os queratinócitos podem se transformar em dois fenótipos reparadores: os fibroblastos e os miofibroblastos, que produzem os precursores do colágeno e da matriz (MYRNA et al., 2009) e reparam o tecido (KLAUSNER et al., 2007). O estroma possui caráter hidrofílico e é osmoticamente ativo, atraindo água para o seu interior, o que possibilita a passagem de substâncias hidrofílicas e dificulta a passagem de substâncias lipofílicas (SCHOENWALD, 1990).

MEMBRANA DE BOWMAN

A camada de Bowman é acelular e homogênea, composta de fibras colágenas, que estão dispostas em estratos na zona central, mas sem estratificação aparente na zona periférica, e de proteoglicanas (KLAUSNER et al., 2007). Possui de 8 a 16 μm de espessura e não possui a capacidade de regeneração (PATEL e McGHEE, 2005). Quando ocorre uma lesão nesta estrutura, sua transparência é rapidamente comprometida, reduzindo a acuidade visual. Esta camada atua como uma barreira para a entrada de microrganismos e células tumorais e na manutenção da integridade e da organização da camada superior da córnea, o epitélio. Ainda, na membrana de Bowman existem poros que possibilitam a passagem de ramos terminais que fornecem a inervação corneana (MCLEAN, 1994).

EPITÉLIO

O epitélio é a camada mais superficial da córnea. Constitui cerca de 10% da sua espessura total, o que corresponde a aproximadamente 50 μm (KLAUSNER et al., 2007). É responsável pela absorção de nutrientes e oxigênio, bem como pela proteção das estruturas internas oculares (DANIELS et al., 2001). O tecido epitelial é formado por cinco a sete camadas de células não queratinizadas (KLAUSNER et al., 2007), que se agrupam em três categorias: células superficiais, células intermediárias e células basais, constituindo o epitélio estratificado pavimentoso (PATEL e McGHEE, 2005).

As células superficiais são poligonais e achatadas com, aproximadamente, 4 a 6 μm na região dos núcleos e de 2 μm na região periférica. Apresentam microvilosidades que aumentam a sua superfície de contato com o fluido lacrimal, de onde retiram parte da sua nutrição (NISHIDA et al., 1998). A principal função dessas células, que estão em contato com o meio externo, é atuar como barreira à penetração de substâncias estranhas. Isto só é possível devido a um complexo sistema de adesão intercelular, realizado pelos desmossomos, denominado “*zônula ocludens*” (WATSKY, 1999; PATEL e MCGHEE, 2005). O sistema de adesão evita também a descamação prematura e excessiva das células epiteliais da córnea (WATSKY, 1999).

As células intermediárias possuem um formato alongado, com um núcleo tipicamente ovalado. São constituídas por duas ou três camadas que repousam sobre as células basais, as quais estão fortemente aderidas devido à ação de desmossomos locais (WATSKY, 1999). Já as células basais, camada celular mais interna, são colunares, com 18 a 20 μm de altura e 8 a 10 μm de diâmetro. São as células que possuem maior atividade celular, com alta taxa de mitose (LU et al., 2001). De rápida replicação e autorregenerativas, são completamente substituídas em um período de cinco a sete dias (KLAUSNER et al., 2007). Acredita-se que os grânulos de glicogênio presentes no seu citoplasma sirvam como reserva energética para a atividade mitogênica, o que possibilita a rápida renovação celular (KINOSHITA et al., 2001; LU et al., 2001).

Sabe-se que, fisiologicamente, as camadas mais superficiais da córnea são liberadas no filme lacrimal, necessitando, portanto, da sua substituição e reposição, o que é realizado pelas células basais (EVANS et al., 2005). Existem algumas teorias que explicam essa movimentação celular. A primeira delas foi descrita por Thoft e Friend (1983), conhecida como a hipótese “X, Y e Z”. Nesta teoria o “X” representa a proliferação das células epiteliais basais; “Y” a proliferação e migração centrípeta das células epiteliais límbicas, presentes na região que separa a córnea da esclera; e “Z” a perda celular epitelial da superfície. Sendo que, para manter um estado de equilíbrio é necessário que “X” + “Y”, resultem em “Z”. Outra teoria, de Nagasaki e Zhao (2003), descreve que as células epiteliais das camadas basais e suprabasais são capazes de se mover centripetamente a uma velocidade de 26

$\mu\text{m}/\text{dia}$, o que garante o processo de renovação contínua do epitélio corneano, um processo fisiológico, necessário para a manutenção da estrutura da córnea (LU et al., 2001).

FILME LACRIMAL

A parte exposta do globo ocular é recoberta por uma fina camada de fluido, denominado fluido ou filme lacrimal. Com um volume aproximado de 7,0 a 10 μL (WEI et al., 2002; HAO et al., 2010) e espessura de 7 a 40 μm (CREECH et al., 1998), é considerado por Hartley et al. (2006) e Davidson e Kuonen (2004) como uma estrutura contendo sete principais funções, sendo elas: manutenção de uma superfície ocular plana, ideal para a refração da luz; lubrificação das pálpebras; lubrificação da conjuntiva e da córnea; fornecimento de nutrientes e oxigênio a córnea; remoção de metabólitos, células mortas e materiais estranhos; defesa contra microrganismos; defesa contra agentes externos.

Inicialmente descrito por Wolff (1946), o fluido lacrimal é caracterizado como uma estrutura composta por três camadas, da mais interna para a mais externa, são elas: camada basal de mucina, camada aquosa central e camada lipídica superficial (PATEL e FARREL, 1989) (Figura 4).

Figura 4: Representação esquemática do fluido lacrimal pré-corneal (Adaptado de LUDWIG, 2005).

A camada de mucina está intimamente associada às células epiteliais da córnea e da conjuntiva, e constitui cerca de 0,2% do volume total do fluido lacrimal (WALLCOTT, 1998). É formada pelas criptas de Henle, glândulas de Manz, células epiteliais corneanas (DAVIDSON e KUONEN, 2004) e, principalmente, pelas células caliciformes da conjuntiva (HARTLEY et al., 2006). Seu principal componente é a glicoproteína denominada mucina, porém também fazem parte do muco as imunoglobulinas, ureia, sais, glicose, leucócitos, restos celulares e enzimas (LUDWIG, 2005).

Essa camada atua como uma interface entre a superfície ocular, representada pelo epitélio da córnea e da conjuntiva, que são hidrofóbicos, e a camada aquosa do filme lacrimal, que é hidrofílica, facilitando assim a dispersão do filme por toda a superfície ocular de maneira uniforme (DAVIDSON e KUONEN, 2004; HARTLEY et al., 2006). Da mesma forma que é responsável pela coesão e estabilidade do fluido lacrimal (WATANABE, 2002), esta camada funciona também como a principal barreira à contaminação bacteriana (LUDWIG, 2005) e a difusão de macromoléculas (KHANVILKAR et al., 2001). Alterações nesta camada estão diretamente associadas a prejuízos na tensão superficial e na estabilidade da lágrima.

A camada aquosa, por sua vez, representa 99,78% do volume total do fluido lacrimal (WALLCOTT, 1998). É produzida pelas glândulas lacrimais principais (70%) e acessórias (30%) (HARTLEY et al., 2006). Sua principal função é o transporte de nutrientes solúveis em água como glicose, ureia, retinol, ácido ascórbico; e a remoção de substâncias estranhas. No entanto, também estão presentes nesta camada substâncias bactericidas, tais como imunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, β -lisina e defensinas (BAEYENS e GURNY, 1997; NAGYOVA e TIFFANY, 1999), além de componentes essenciais para a proliferação e diferenciação do epitélio corneano, como os fatores de crescimento e vitamina A (DAVIDSON e KUONEN, 2004; McCULLEY et al., 2006; HARTLEY et al., 2006).

A camada lipídica é a mais externa do filme lacrimal e corresponde a apenas 0,02% de seu volume total (WALLCOTT, 1998). É secretada pelas glândulas de Zeiss, Moll e, principalmente pelas glândulas de meibômio, que se localizam nas pálpebras (STEVES et al., 1994). Essa camada é composta por lipídeos polares e apolares, sendo que a fração polar tem propriedades tensoativas, espalhando-se pela camada aquosa do filme lacrimal; enquanto a apolar permanece em contato

com o meio externo (HARTLEY et al., 2006). Tem como função retardar a evaporação da lágrima e estabilizar o filme lacrimal, a fim de produzir uma superfície óptica plana (STEVES et al., 1994; HARTLEY et al., 2006), além de prevenir a contaminação do filme lacrimal por corpos estranhos e restos celulares (DAVIDSON e KUONEN, 2004).

No filme lacrimal é possível identificar ainda alguns hormônios como a insulina, prolactina e hormônio da tireoide, bem como diversos eletrólitos como Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^- , HCO_3^- (OHASHI et al., 1989; SULLIVAN e HANN, 1989; ROCHA et al., 2002). É justamente a presença e a concentração desses eletrólitos que determinam a osmolalidade e o pH do fluido lacrimal (HOLLY e ESQUIVEL, 1985). Em números, fisiologicamente, o olho humano possui uma osmolalidade média de 302 ± 9.7 mOsm/Kg (TOMLINSON et al., 2006) e um pH entre 6,5 e 7,6 (SMOLIN; THOFT, 1987).

Assim, conhecendo a fisiologia da córnea e a estrutura do filme lacrimal, e compreendendo que eles constituem uma unidade funcional única, considerada a principal superfície refrativa do olho humano (HUANG et al., 2002), pode-se categorizar agora de maneira mais concisa algumas doenças que acometem a superfície ocular.

2.2. Doenças associadas ao segmento anterior do olho

2.2.1. Síndrome do olho seco

A síndrome do olho seco, também conhecida como *ceratoconjuntivite sicca*, é uma doença multifuncional das lágrimas e da superfície ocular (DEWS, 2007), caracterizada por alterações quantitativas e/ou qualitativas do filme lacrimal (PATEL e FARREL, 1989). Nesta síndrome, são observados sintomas de desconforto, perturbação visual e instabilidade da lágrima, com dano potencial à superfície ocular (DEWS, 2007). Sua prevalência varia de 5 a 33% na população em geral, cuja variabilidade depende do desenho do estudo e das características da população analisada (BANDEEN-ROCHE et al., 1997; LEE et al., 2002; LEMP, 1998; SCHAUMBERG et al., 2002; LIN et al., 2005; DEWS, 2007).

Há muitos anos, a SOS é considerada como uma das condições clínicas mais frequentes na prática oftalmológica diária (BREWITT e SISTANI, 2001; DEWS, 2007; MILJANOVIC et al., 2007; LEMP, 2008; FONSECA et al., 2010). De acordo com

Gayton (2009), 25% dos pacientes que buscam atendimento oftalmológico apresentam sintomas da síndrome do olho seco. Hoje ela é considerada a segunda alteração mais comum que acomete o tecido conjuntivo, ficando atrás somente da artrite reumatoide (LEMP, 2008).

De acordo com o *Dry Eye Workshop* (DEWS, 2007), de maneira simplificada, a SOS pode ser dividida em duas principais categorias, levando em consideração a origem da doença. A primeira categoria está relacionada à deficiência da porção aquosa do filme lacrimal e a segunda às alterações evaporativas observadas na superfície ocular. Quando a SOS ocorre devido à deficiência aquosa, ela pode estar relacionada à manifestação de doenças autoimunes, como por exemplo, a *Síndrome de Sjögren*, ou ser decorrente da deficiência da glândula lacrimal, obstrução do ducto lacrimal, hiposecreção reflexa e uso de certos tipos de medicamentos. Porém, quando relacionada ao estado evaporativo, esta pode ocorrer devido às disfunções nas glândulas de Meibômio, desordens do fechamento palpebral, baixa frequência ao piscar, ação sistêmica de fármacos, uso de lente de contato e deficiência de vitamina A.

De uma maneira geral, a baixa qualidade e quantidade de fluido lacrimal pode provocar a inflamação crônica da córnea, conjuntiva e das glândulas lacrimais. Pode também comprometer o deslizamento normal das pálpebras, o que torna deficiente ou nula a função protetora do fluido lacrimal, propiciando assim infecções secundárias, que podem evoluir para destruição tecidual e cegueira (GILBARD et al., 1987).

Na superfície ocular, especificamente, a SOS propicia o desenvolvimento de um ambiente inflamatório mediado pelas células epiteliais da córnea e os linfócitos. Essas células são estimuladas a produzir e a secretar diversas citocinas pró-inflamatórias, que associadas à redução dos promotores de crescimento provocada pela própria síndrome, tais como o fator de crescimento epidermal (EGF) e o retinol, reduzem a proliferação e diferenciação epitelial da córnea. Essa queda acentuada da atividade mitótica local representa um obstáculo para o processo fisiológico de regeneração da córnea. Além disso, também é observada a redução da produção de mucina e de células caliciformes, bem como o aumento do número de células metaplásicas e da queratinização epitelial (TSENG et al., 1997; SOLOMON et al., 2001; ZOUKHRI e KUBLIN, 2001).

De acordo com alguns autores, a hiperosmolalidade é o primeiro sinal de desconforto, dano na superfície ocular e inflamação observada na SOS (TOMLINSON et al., 2006; DEWS, 2007). Os pacientes apresentam uma osmolalidade da lágrima aumentada, sendo geralmente superior a 316 mOsmol/Kg (TOMLINSON et al., 2006). Também é observado alteração do pH do filme lacrimal, cuja média nos pacientes saudáveis é de 7,4, e nos que podem apresentar SOS é de 7,9 (FARRIS et al., 1996; TOMLINSON et al., 2006).

Embora haja portadores assintomáticos, a maioria dos indivíduos com a SOS apresentam sintomas como: sensação de corpo estranho, queimação, prurido, ardor, fotofobia e embaçamento visual, que causam um impacto negativo na qualidade de vida destes pacientes (MILJANOVIC et al., 2007). Além disso, essa síndrome ainda pode resultar em sérias complicações oftalmológicas, como ressecamento epitelial, úlceras e perfurações na córnea, predisposição a infecções e até cegueira (LEMP, 1995 SULLIVAN et al., 1999).

2.2.2. Lesões no epitélio corneano

A córnea é a estrutura mais externa do globo ocular que está em contato direto com o meio ambiente, sendo recoberta apenas pelo fluido lacrimal (KLAUSNER et al., 2007). Essa exposição constante torna-a mais suscetível a sofrer danos ou lesões, principalmente de origem traumática (físico ou químico) e infecciosa. Porém, esses não são os únicos fatores que desencadeiam as lesões na córnea. Fatores intrínsecos como alterações metabólicas, processos degenerativos, ceratocone e aumento da pressão intra-ocular também estão relacionadas ao dano tecidual local (SLATTER e DIETRICH, 2007).

Independente da origem e do grau da lesão, logo após o comprometimento da superfície ocular, é de fundamental importância que se inicie o processo de cicatrização, com o intuito de reestabelecer a integridade da superfície da córnea e, conseqüentemente, a sua transparência, qualidade ótica e função de barreira (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001; LU et al., 2001). Quando a lesão ocasionada gera a perda de uma ou mais camadas superficiais do epitélio corneano é denominada erosão ou abrasão. No entanto, quando é observada a perda total do epitélio, com o comprometimento ou não do estroma, é considerada úlcera (KERN, 1994).

Em condições normais, imediatamente após a lesão na córnea tem-se início o processo de cicatrização, que é, basicamente, a amplificação do processo fisiológico de regeneração, descrito no item 2.1.3.. No entanto, envolve ainda interações entre as células epiteliais, estromais, a glândula lacrimal e as células do sistema imunológico (LU et al., 2001). Didaticamente, o reparo de lesões na córnea pode ser dividido em três fases, de acordo com o tipo de fenômeno preponderante: migração, proliferação e adesão epitelial. Porém, todos esses eventos são interdependentes e ocorrem simultaneamente (DUA et al., 1994; LU et al., 2001). A intensidade da contribuição de cada um é que varia de acordo com a área, a profundidade e a causa da lesão (DUA et al., 1994).

Logo após o comprometimento celular observa-se a cessação da atividade mitótica local. Neste primeiro momento, ocorre a migração celular tanto de células epiteliais intactas presentes na periferia da lesão, como de células da camada basal da córnea. As primeiras se tornam achatadas e as suas membranas emitem processos digitiformes (*filopodia*) ou coraliformes (*lamellipodia*), em direção à ferida (CROSSON et al., 1986). As células basais, devido a um rearranjo das fibras de actina, migram com movimentos amebóides para a superfície ocular (GIPSON et al., 1982).

Em seguida, evidencia-se uma intensa atividade mitótica (HANNA e O'BRIEN, 1960; LU et al., 2001), dando início a fase proliferativa. Esta fase ocorre entre 24 e 30 horas após a lesão (NISHIDA et al., 1983) e permanece até que a espessura epitelial seja restabelecida. Nesta etapa, que pode se prolongar durante meses após a lesão, observa-se, ainda, o aumento da concentração de fibronectina, fibrinogênio e fibrina, importantes na adesão celular (LU et al., 2001; FILENIUS et al., 2003). Ao término da reepitelização, as "junções ocludentes" se refazem e restauram a permeabilidade seletiva do epitélio (LU et al., 2001).

As células do sistema imune e a glândula lacrimal também exercem papel fundamental no processo de cicatrização do epitélio corneano. De acordo com Wilson et al. (1996), são as citocinas liberadas logo após as lesões que ativam o processo de regeneração epitelial. A interleucina-1 (IL-1), por exemplo, modula a apoptose dos queratinócitos e fibroblastos corneanos, regula a produção de fatores de crescimento e a expressão de metaloproteinases. Mecanismos estes que estão

diretamente envolvidos na proliferação, motilidade e diferenciação das células do epitélio e na remodelação da matriz estromal corneana (STRISSEL et al., 1997).

Já a glândula lacrimal induz a produção do fator de crescimento de hepatócito (HGF), diretamente relacionado com a migração celular, e do fator de crescimento epidermal (EGF), potente ativador do processo de mitose (LI e TSENG, 1995). Juntos, HGF e EGF modulam a regeneração epitelial (TERVO et al., 1997; WILSON et al., 1999). A glândula lacrimal regula também, principalmente nas primeiras etapas da cicatrização, a liberação e produção da IL-1 (WILSON et al., 2001).

A última etapa do processo de cicatrização da córnea depende do grau de comprometimento da lesão. Quando se trata de lesões superficiais, a completa restauração da arquitetura normal do epitélio pode ocorrer em cinco a sete dias, se não ocorrer infecção. Porém, quando a lesão atinge o endotélio pode levar meses para fechamento da ferida e ainda resultar em opacificação permanente da córnea (KERN, 1994). No entanto, o grande problema das lesões na córnea é quando o processo de cicatrização normal é retardado ou simplesmente não ocorre, o que pode levar a prejuízos visuais temporários ou definitivos para o indivíduo, dependendo do grau de comprometimento tissular (SO et al., 2008).

2.2.3. *Diabetes mellitus* e as alterações na superfície ocular

O *Diabetes mellitus* (DM) tem sido associado, juntamente com o envelhecimento, como o principal fator de risco responsável pelo desenvolvimento de doenças no globo ocular (MOSS et al., 2000 + MOSS et al., 2004). Suas repercussões oftalmológicas são variadas e incluem desde as complicações mais conhecidas, como a retinopatia diabética e a catarata, até erros refracionais, glaucoma neovascular, paresias oculomotoras, defeitos epiteliais persistentes e a diminuição da sensibilidade corneana (AZAR et al., 1992; GOEBBELS, 2000). No entanto, nos últimos anos a sua relação com as lesões epiteliais da córnea e com os distúrbios no funcionamento das glândulas lacrimais tem sido muito discutido (RAMOS-REMUS et al., 1994; GOEBBELS, 2000; DOGRU et al., 2001; KAISERMAN et al., 2005).

Estudos verificaram que os pacientes diabéticos apresentam retardo no processo de cicatrização da córnea e que, frequentemente, queixam-se de sintomas típicos da síndrome do olho seco, como a queima e a sensação de corpo estranho

(DOGRU et al., 2001). Alguns autores apontam a hiperglicemia crônica (EBARA et al., 2000; GINSBERG et al., 2000), o estresse oxidativo causado por ela, as alterações nervosas e os distúrbios na sinalização da insulina, como as principais causas dessas alterações oculares (ISHIDA et al., 1984; ROCHA et al., 2000; PEPONIS et al., 2002; ALVES et al., 2005).

A hiperglicemia crônica, por exemplo, provoca anormalidades no fluxo de sangue e o aumento da permeabilidade vascular. O que, em conjunto, podem levar ao edema, isquemia, neovascularização e degeneração periférica dos nervos (ISHIDA et al., 1984; AZAR et al., 1992). No entanto, a principal consequência do desbalanço normoglicêmico é a indução dos produtos de glicação avançada, os conhecidos AGEs (do inglês, *Advanced Glycated End-products*), cuja formação e acúmulo nos tecidos oculares e na glândula lacrimal, durante o diabetes, reforçam o papel deste desbalanço nas complicações oftálmicas (BROWNLEE, 2001; ALVES et al., 2005).

Os AGEs são os responsáveis pela ativação da cascata intracelular de sinalização do NF- κ B, que promove a liberação de um grande número de genes, incluindo as citocinas pró-inflamatórias. Na glândula lacrimal, por exemplo, a expressão das citocinas do sistema imune inato, como o TNF- α e a IL-1 β , estão claramente envolvidas na insuficiência tecidual em modelos animais (ALVES et al., 2005; ALVES et al., 2008). Já na superfície ocular, o acúmulo dos AGEs alteram a adesão e a migração celular, levando aos defeitos epiteliais recorrentes e ao retardo da cicatrização de lesões na córnea (SADY et al., 1995; KAJI et al., 2000).

A hiperglicemia crônica também induz o estresse oxidativo, que exerce influência tanto na superfície ocular, como na glândula lacrimal. Sob estresse, as células endoteliais da córnea reagem aumentando o nível intracelular de cálcio e se proliferando, o que, em excesso, pode levar à fibrose tecidual e, conseqüentemente, a morte celular (KAJI et al., 2003; RIOS et al., 2005). Já na glândula, observam-se tanto alterações histológicas, quanto o acúmulo progressivo de grânulos de lipofuccina intracelular, produto insolúvel, não degradável pelas enzimas lisossomais, cujo excesso diminui a vida celular (RIOS et al., 2005; MODULO et al., 2009) e interfere na produção de fluido lacrimal pelas células acinares.

As alterações nervosas, observadas tanto no diabetes quanto no envelhecimento, também influenciam na fisiologia da superfície ocular e da glândula lacrimal (MATHERS et al., 1996). Em condições normais, o arco reflexo é a via nervosa responsável pelo movimento do fechamento completo e periódico das pálpebras durante o piscar. Este movimento que garante a distribuição homogênea da lágrima sob a superfície ocular e posterior drenagem para o sistema nasolacrimal, propiciando a estabilidade do filme lacrimal e a renovação de seus constituintes (TSUBOTA e NAKAMORI, 1995). No entanto, em decorrência do diabetes e do envelhecimento, observa-se falhas neste processo, com a consequente diminuição da motricidade palpebral e redução da secreção e distribuição do fluido na superfície ocular, o que diminui a sensibilidade corneana, leva ao ressecamento da córnea e o desenvolvimento de defeitos epiteliais de difícil cicatrização (HEIGLE e PFLUGFELDER, 1996).

Por último, diversos estudos têm relacionado os defeitos na sinalização da insulina, apresentados pelos pacientes diabéticos, com a prevalência da síndrome do olho seco (RAMOS-REMUS et al., 1994; GOEBBELS, 2000; ROCHA et al., 2000, ROCHA et al., 2002) e as dificuldades de regeneração da córnea (ISHIDA et al., 1984; SULLIVAN e HANN, 1989; ROCHA et al., 2000; ROCHA et al., 2002). Sabe-se que é justamente a redução e/ou ausência da insulina que desencadeia o desbalanço normoglicêmico e então provoca a hiperglicemia, com o potencial risco do desenvolvimento do ambiente inflamatório. No entanto, se por um lado a ausência de insulina desencadeia a hiperglicemia crônica e o dano tecidual, por outro a sua presença está relacionada à homeostase da córnea (MODULO et al., 2009).

A necessidade da suplementação com insulina de meios de cultura de células primárias da córnea e da glândula lacrimal foi um dos primeiros indícios da relação benéfica existente entre a presença da insulina e essas complicações oftálmicas (SCHULTZ et al., 1992). Anos depois, ainda *in vitro*, foi demonstrado que a exposição à insulina facilitava o fechamento de pequenas feridas em cultura de células epiteliais humanas, o que ocorria através do aumento da migração celular (SHANLEY et al., 2004).

No entanto, foi a confirmação da presença dos receptores e dos fatores de crescimento ligados a insulina (IGF-1R) na superfície ocular e na glândula lacrimal

(FINI, 1999; ROCHA et al., 2000; KLENKLER e SHEARDOWN, 2004), bem como a identificação deste hormônio tanto no filme, como na superfície ocular (ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2005; ALVES et al., 2008; YU et al., 2010; ABDELKADER et al., 2011), associadas as características metabólicas e mitogênicas desempenhadas pela insulina em diversos tecidos alvos (ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2007; ALVES et al., 2008), que reforçaram a sua ação local e apontaram para sua possível ação no combate e/ou retardo dessas alterações oculares.

De fato, a insulina tem sido alvo constante de pesquisas envolvendo a promoção da cicatrização de lesões na córnea (CUNHA et al., 2005; ZAGON et al., 2006; ZAGON et al., 2007; ALVES et al., 2008; WEI-LI, 2009; YU et al., 2010; BASTION e LING, 2013; HAMPEL et al., 2013) e, também, mostrou ser promissora na prevenção de lesões na glândula lacrimal, importante para o tratamento da SOS (MODULO et al., 2009).

2.3. Tratamento da síndrome do olho seco e das lesões na córnea

Apesar dos problemas relacionados à cicatrização de lesões na córnea serem considerados uma das alterações oculares de maior frequência mundial, representando a terceira maior causa de cegueira no mundo (TANDON et al., 2010), e da alta prevalência da SOS nos últimos anos (LIN et al., 2005; MILJANOVIC et al., 2007; DEWS, 2007; LEMP, 2008), não existe, atualmente, tratamento seguro e eficaz para a cicatrização da córnea (TANDON et al., 2010) e o tratamento para o olho seco é predominantemente sintomático (FONSECA et al., 2010).

Embora os corticosteróides tópicos sejam frequentemente empregados para a promoção da cicatrização de lesões na córnea, eles são benéficos apenas em curto prazo. Muitos causam efeitos colaterais e raramente são considerados eficazes na redução efetiva das lesões (PRICE et al., 2001). Vários outros agentes, tais como inibidores sintéticos de metaloproteinase, ciclosporina-A, vitamina E, diclofenaco, entre outros têm demonstrado algum benefício em estudos com animais. No entanto, sua alta toxicidade ocular combinada com outros efeitos colaterais deletérios limita a sua utilização em seres humanos (BILGIHAN et al., 2000; TANDON et al., 2010).

Já o tratamento da SOS, geralmente, envolve a administração de anti-inflamatórios ou secretagogos que atuam como paliativos, mas não resolvem o

problema (FONSECA et al., 2010). Algumas estratégias, como a instilação de lágrimas artificiais sem preservantes, oclusão de um ou dos dois pontos lacrimais, óculos de proteção, tarsorrafia provisória, transplante de limbo (nos casos de deficiência das células germinativas do limbo), lente de contato terapêutica, membrana amniótica ou associação de duas ou mais dessas opções são também usadas no tratamento da SOS (MALAVAZZI et al., 2005). As terapias mais convencionais utilizam lágrimas artificiais e lentes de contato terapêutica, no entanto, muitas vezes falham (ZAGON et al., 2007). Apesar de essas estratégias serem frequentemente utilizadas na prática clínica, muitas não possuem avaliações comparativas por estudos clínicos ou de longo prazo (FONSECA et al., 2010).

Desta forma, a ineficácia e em alguns casos, as complicações e toxicidades das práticas atuais utilizadas no tratamento de lesões na córnea e da SOS ilustram os riscos inerentes dos tratamentos disponíveis e a necessidade do desenvolvimento de terapias mais seguras (TANDON et al., 2010). Neste contexto, as recentes elucidações dos mecanismos envolvidos na hiperglicemia crônica, no estresse oxidativo e nos defeitos na sinalização da insulina, impulsionaram a pesquisa de tratamentos potenciais das alterações da superfície ocular e da SOS (PEPONIS et al., 2002; ALVES et al., 2005; ALVES et al., 2008).

Degenhardt et al. (2002), por exemplo, verificaram que os agentes anti-AGEs possuem um potencial efeito protetor contra a retinopatia diabética durante a hiperglicemia crônica. Já Peponis et al. (2004) comprovaram que a suplementação diária com vitamina C e E pode melhorar alguns parâmetros fisiológicos da superfície ocular em pacientes diabéticos, em resposta ao dano oxidativo. Yin et al. (1998) e Jorge et al. (2009) demonstraram a ação da aspirina, conhecida por contrapor complicações diabéticas e inibir a cascata de sinalização do NF- κ B, no tratamento de danos à superfície ocular e de lesões na glândula lacrimal. De forma semelhante, Beauregard e Brandt (2003) relataram que os agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomo-gamma (PPAR γ) são úteis para melhorar a secreção da glândula lacrimal devido a inibição da produção de IL-1 β e de óxido nítrico. No entanto, nos últimos anos, o envolvimento da insulina na promoção da cicatrização da córnea (CUNHA et al., 2005; ZAGON et al., 2006; ZAGON et al., 2007; ALVES et al., 2008; WEI-LI, 2009; YU et al., 2010; HAMPEL et al., 2013; BASTION et al.,

2013) e como um possível aliado no tratamento da SOS (MODULO et al., 2009), tem merecido destaque.

Em 2006, Zagon et al. demonstraram *in vivo*, em ratos diabéticos, que a terapia intensiva com a insulina, necessária para restabelecer a normoglicemia dos animais, evitou os problemas de retardo e dificuldade de cicatrização do epitélio corneano. No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisadores chegou à conclusão de que a insulina aplicada topicamente é capaz de normalizar o processo de reepitelização da córnea em ratos diabéticos (ZAGON et al., 2007). Sob a coordenação de Wei-Li (2009), no hospital universitário de Taiwan, um estudo clínico randomizado em humanos, verificou que a utilização da insulina associada ao tratamento convencional favoreceu o fechamento de lesões na córnea após a cirurgia de *vitrectomia pars plana* (PPV) e o transplante de córnea. Resultado semelhante foi observado por Bastion et al. (2013), no qual a incorporação da insulina ao tratamento usual acelerou, em humanos, o fechamento das lesões após a cirurgia vítreo-retiniana.

Alguns estudos reforçam ainda mais a utilização da insulina tópica ocular. De acordo com Liu et al. (2009), por exemplo, o tratamento com a insulina, quando comparado com outros fatores de crescimento utilizados para promover o reparo de lesões na córnea, é o mais barato, mais prontamente disponível e o seu uso em humanos é aprovado pelo FDA. Bartlett et al. (1994b) demonstrou que os colírios contendo insulina eram confortáveis tanto para a córnea quanto para a conjuntiva, semelhantes inclusive a instilação de uma simples solução salina estéril, cuja segurança estava assegurada mesmo após a exposição multi-dose, quando veiculados na concentração de 100 UI/mL. Resultado também encontrado por Zagon et al. (2007), que demonstrou que a insulina administrada topicamente, em longo prazo, nos animais diabéticos, na concentração de até 100 UI/mL, em solução isotônica com cloreto de sódio, não apresenta toxicidade.

No entanto, se por um lado, os estudos envolvendo a ação da insulina na cicatrização de lesões na córnea estão bem avançados, a ação do hormônio na restauração da glândula lacrimal em pacientes diabéticos ainda é pouco conhecida. Até o momento, o único tratamento realizado *in vivo*, com ratos diabéticos, envolveu a administração subcutânea de baixas doses de insulina. Neste trabalho, o tratamento diário, com 1 UI/mL de insulina, além de induzir a mitose e proliferação

celular, relevantes para a promoção da cicatrização de lesões na córnea, foi capaz de retardar o surgimento de algumas modificações bioquímicas e estruturais presentes nas glândulas lacrimais dos animais tratados, quando comparados aos animais não tratados (MODULO et al., 2009).

2.4. Insulina - estrutura e aplicação ocular

A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido (CHEATHAN e KAHN, 1995; NAVARRO et al., 1999). Produzida e secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas (CARVALHEIRA et al., 2002) ela é essencial para a manutenção da homeostase da glicose e, portanto, responsável pela disponibilidade dos substratos energéticos (CHEATHAN e KAHN, 1995; NAVARRO et al., 1999). Além disso, este hormônio está diretamente relacionado a outros eventos celulares, como a regulação do transporte de íons e aminoácidos, metabolismo dos lipídeos, síntese de glicogênio, proteínas e DNA. A insulina é, portanto, uma substância primordial para o armazenamento dos nutrientes absorvidos pela ingesta e para o crescimento e diferenciação celular (WHITE e KAHN, 1994; CHEATHAN e KAHN, 1995; NAVARRO et al., 1999).

Sua molécula é constituída por duas cadeias polipeptídicas, α e β , com respectivamente 21 e 30 aminoácidos, que se mantêm interligadas por duas pontes dissulfeto, nas posições A7 e B7; A20 e B19 (ZIB e RASKIN, 2006; VAREWIJCK e JANSSEN, 2012) (Figura 5).

Figura 5: Representação esquemática da molécula de insulina (Adaptado de Varewijck e Janssen, 2012).

Dos 51 aminoácidos que constituem a molécula da insulina, seis apresentam carga positiva e dez, negativa, resultando em um residual de cargas negativo. Porém, sobre influência constante do pH. Seu ponto isoelétrico (pI) encontra-se entre 5,3 e 5,4 e, num intervalo de pH próximo ao seu pI, em meio aquoso, a insulina pode precipitar. A sua solubilidade depende, além do pH e do pI, da sua pureza, da natureza do solvente, da temperatura e da concentração de íons metálicos divalentes (BRANGE, 1987).

A insulina pura é muito estável. Em soluções com pH de 4 e temperatura de 2°C, pode manter-se estável durante anos. Alguns estudos demonstraram que a sua atividade biológica pode ser mantida durante dois anos quando armazenada a 0°C. No entanto, quando armazenada em temperatura de 20 a 25 °C, sua potência diminui em 20% logo após o primeiro ano. Em soluções fortemente alcalinas observa-se a quebra das pontes dissulfeto e, conseqüentemente, a degradação da insulina (BRANGE, 1987).

A luz compromete a estabilidade da insulina. Se por um lado, as radiações UV degradam os resíduos de cisteína, por outro a foto-oxidação conduz a degradação do grupo imidazol no resíduo de histidina, ambos com potencial perda da atividade biológica. A insulina também possui baixa estabilidade enzimática, sofrendo clivagem na presença das endopeptidases tripsina e α -quimiotripsina (CHIEN et al., 1996).

A atividade biológica da insulina é completamente dependente da manutenção de sua estrutura tridimensional, que por sua vez, é determinada pela presença das pontes dissulfeto intra e inter-cadeia de aminoácidos (CHIEN et al., 1996). Esse hormônio pode ser encontrado na forma de monômero, dímero ou hexâmero, que varia, principalmente, de acordo com a sua concentração no meio. Em baixas concentrações ($< 0,1 \mu\text{M}$) a molécula de insulina existe como um monômero, com diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 2,6 nm. Esta é a forma encontrada fisiologicamente na circulação sanguínea e a que assegura a sua ligação ao receptor transmembrana. Em concentrações superiores, a insulina dimeriza, tornando-se elipsoide. Em soluções neutras, ou ligeiramente ácidas (pH 4-8) e concentrações superiores a $2 \mu\text{M}$, pode ocorrer a associação de três dímeros, formando o hexâmero, com um forma esférica ligeiramente achatada e raio

hidrodinâmico de, aproximadamente, 5,6 nm (CHIEN et al., 1996). Dependendo da concentração, pH, íons metálicos e sais, pode haver, em solução, um equilíbrio entre monômeros, dímeros e hexâmeros (BRANGE, 1987) (Figura 6).

Figura 6: Estrutura tridimensional da molécula de insulina. A) monômero; B) dímero; C) hexâmero (Adaptado de Whittingham et al., 2006).

Existem diferentes tipos de insulina, as de origem animal, como a bovina e a suína, e as artificiais produzidas, por exemplo, por engenharia genética. Inicialmente, o tratamento dos pacientes diabéticos insulino-dependentes era realizado com insulinas de origem animal (POLONSKY, 2012). Apesar de existir uma grande semelhança entre essas insulinas, a composição dos seus aminoácidos varia um pouco. A insulina humana difere da suína em um único aminoácido, na posição B30, havendo a substituição de uma treonina (humana) para alanina (suína); enquanto a bovina difere em três, nas posições A8, A10 e B30, respectivamente treonina, isoleucina e treonina (humana) e alanina, valina e alanina (bovina). O peso molecular também é diferente, sendo 5,734 kDa na humana e, 5,703 e 5,747 kDa, na bovina e suína, respectivamente (NOITE e KARAM, 2005). Essas pequenas diferenças, associadas à rudimentariedade das primeiras técnicas de purificação da insulina, que deixavam pequenas quantidades de contaminantes, fizeram com que alguns pacientes apresentassem reações alérgicas e/ou desenvolvessem anticorpos com o intuito de neutralizá-las (DAVIS e GRANNER, 2005).

Atualmente, após o advento e desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante, a insulina humana recombinante, com estrutura idêntica ao hormônio humano, está amplamente disponível e, por isso, é a utilizada nestes pacientes,

proporcionando menos efeitos secundários. Vários estudos demonstraram que as insulinas recombinantes são quimicamente e funcionalmente semelhantes à insulina endógena (DAVIS e GRANNER, 2005).

A potência da insulina foi inicialmente estabelecida pela quantidade de hormônio necessário para reduzir o nível de açúcar no sangue de um coelho em 0,045% dentro de quatro horas (SINDING, 2002). Hoje, representada por unidade internacional (UI), um UI de insulina equivale a aproximadamente 3,5 mg de pó padrão dos cristais de insulina recombinante humano (BRYANT et al., 2007).

O efeito da insulina se inicia quando ela se liga a um receptor específico na membrana plasmática, pertencente a família dos receptores tirosina quinase. Esse receptor é formado por dois heterodímeros ligados de modo covalente, cada um contendo uma subunidade α que é totalmente extracelular e constitui o local de reconhecimento, e uma subunidade β que se estende pela membrana (KASUGA et al., 1982; NOITE e KARAM, 2005).

A ligação de uma molécula de insulina às subunidades α ativa o receptor e provoca uma alteração conformacional nas subunidades β citoplasmáticas opostas (NOITE e KARAM, 2005), que desencadeiam por sua vez uma cascata de sinalização intracelular, gerando o aumento de transportadores de glicose (GLUT 4), síntese de DNA, glicogênio e proteínas, afluxo de nutrientes e armazenamento de energia. Esses eventos são essenciais para os efeitos metabólicos e mitogênicos desempenhados pela insulina sobre diversos tecidos alvos (ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2007; ALVES et al., 2008). No entanto, além desses efeitos ou do papel da insulina no controle glicêmico, as suas vias de sinalização que regem a mitose e a proliferação celular, também têm sido associadas à manutenção da homeostase da córnea (MODULO et al., 2009) e estão diretamente relacionadas à preservação das características fenotípicas do epitélio corneano (ALVES et al., 2008). O que reforça a sua utilização para o tratamento tópico das lesões na córnea e, possivelmente, da SOS.

2.5. Administração ocular de fármacos

A administração tópica ocular de fármacos é, depois da pele, a via mais acessível, tanto vislumbrando a ação local, na superfície ocular, quanto nas camadas mais profundas do globo ocular. Porém, o maior problema deste tipo de

terapia tópica é a biodisponibilidade local do fármaco (KAUR e KANWAR, 2002). Sabe-se que a maior parte dos fármacos aplicados topicamente no olho é rapidamente drenada através de vários mecanismos, como a lacrimejação, a diluição do fármaco pela lágrima e a renovação da lágrima, resultando em um curto tempo de permanência da formulação na superfície ocular, o que acarreta uma baixa biodisponibilidade local (KAUR e KANWAR, 2002; GHATE e EDELHAUSER, 2006; GUADANA et al., 2009).

Devido a estas perdas, as soluções oftálmicas contêm frequentemente altas concentrações do fármaco para manter a dosagem terapêutica no conteúdo lacrimal ou no sítio de ação. No entanto, o uso frequente de altas concentrações pode levar a efeitos tóxicos indesejáveis e danos às células da superfície ocular (URTTI e SALMINEN, 1993; HOLLANDER e ALDAVE, 2004), além de aumentar os custos com a produção. Uma alternativa que contrapõe a rápida eliminação do fármaco da superfície ocular é o aumento da frequência de instilação, visando manter a concentração terapêutica durante determinado período de tempo (OGURA, 2001). Porém essa prática, além de gerar incômodo, compromete a adesão medicamentosa (OLMEZ et al., 2005).

De fato, os trabalhos desenvolvidos até o momento utilizando a insulina para a cicatrização de lesões na córnea ou utilizaram aplicações invasivas, como implantes (ZAGON et al., 2006) ou soluções aquosas simples (ZAGON et al., 2007; WEI-LI et al., 2009; BASTION et al., 2013), o que repercutiu em elevada frequência de instilações e/ou no desenvolvimento de formulações contendo alta concentração do ativo.

Zagon et al. (2006), por exemplo, em seu primeiro trabalho, utilizou a aplicação de implantes subcutâneo de insulina, com liberação sustentada de duas unidades do fármaco por dia, durante 50 dias, suficiente para restabelecer a normoglicemia dos animais diabéticos e, portanto, evitar os problemas de retardo e dificuldade de cicatrização do epitélio corneano. No entanto, sabendo que o tratamento com implantes é considerado um método invasivo, no ano seguinte, Zagon et al. (2007) veiculou a insulina em uma solução aquosa simples, destinada a aplicação tópica, localizada e não invasiva. Porém foi necessário o tratamento diário, quatro vezes ao dia, durante sete dias, com 1 UI/mL de insulina, para normalizar a reepitelização da córnea em ratos diabéticos, uma frequência de instilação elevada.

Em 2009, o estudo clínico randomizado realizado por Wei-Li et al. (2009), também com a utilização de solução aquosa simples de insulina, contou tanto com uma grande frequência de instilação, quanto com o emprego de uma formulação contendo alta concentração do ativo. Neste caso, os pacientes do grupo experimental receberam após a cirurgia de *vitrectomia pars plana* (PPV) e o transplante de córnea e anterior ao tratamento medicamentoso usual, a terapia com a insulina na concentração de 100 UI/mL, a cada duas horas. Mais recentemente, durante os estudos realizados por Bastion et al., (2013), o fechamento de lesões na córnea só foi obtido com a instilação de uma solução aquosa de insulina com concentração de 50 UI/mL, quatro vezes ao dia, até o fechamento da ferida.

Desta forma, existem atualmente diversos estudos que reforçam a ação da insulina na cicatrização de lesões na córnea, além das vantagens associadas à utilização tópica deste hormônio em relação aos tratamentos usuais, tais como: o custo-eficácia; o aumento da adesão do paciente, por se tratar de um método não invasivo; a facilidade de aplicação; a independência do efeito sistêmico sobre o nível de glicose sérica; a prevenção do metabolismo de primeira passagem; mínimo de reações imunológicas; ausência de tolerância e efeitos adversos (ZAGON et al., 2007). No entanto, até o momento, só foram utilizadas formulações simples, soluções aquosas contendo o fármaco, o que acarreta elevada frequência de instilações e/ou o desenvolvimento de formulações com alta concentração de insulina.

Já para a SOS, os estudos envolvendo a ação da insulina com potencial terapêutico são mais escassos. O único estudo *in vivo* realizado com animais diabéticos envolveu a utilização de dosagens subcutâneas de 1 UI/mL de insulina, diariamente, dois dias após a indução da DM. A estratégia mostrou-se promissora para retardar o surgimento de alterações bioquímicas e estruturais (MODULO et al., 2009), no entanto não foi investigada a ação do hormônio quando a síndrome já estava instalada. Além disso, a via de administração foi invasiva, não localizada, pouco conveniente para os pacientes, além de causar dor, ferimentos e fobia de agulhas.

Assim, apesar de promissor, não foram encontrados na literatura formulações elaboradas ou sistemas de liberação contendo a insulina visando à administração ocular tópica. Sabe-se que a biodisponibilidade local do fármaco pode ser bastante

melhorada com o desenvolvimento de sistemas de liberação que possibilitem o aumento do tempo de residência desta macromolécula na superfície do olho, favorecendo tanto a sua maior penetração nas células da córnea, essencial para a cicatrização de lesões, quanto nas glândulas lacrimais, direcionada para a síndrome do olho seco. Desta forma, no presente trabalho foram desenvolvidas tanto formulações simples, quanto sistemas de liberação, para a veiculação ocular tópica da insulina.

2.5.1. Micropartículas

Sistemas de liberação microparticulados são bastante promissores para a administração de fármacos na córnea (KOMPELLA et al., 2003; AYALASOMAYAJULA e KOMPELLA, 2005; LIU et al., 2008; GUADANA et al., 2009). A incorporação de fármacos em sistemas dispersos de menor diâmetro oferece várias vantagens para a aplicação tópica ocular como, por exemplo: ausência de efeitos que atrapalhem a visão, aumento no tempo de residência do ativo na superfície ocular e nos tecidos intra-oculares e liberação prolongada do fármaco na córnea (PIGNATELLO et al., 2002; VANDERVOORT; LUDWIG, 2007; LIU et al., 2008).

Com diâmetro entre 1-1000 μm (GUADANA et al., 2009) as micropartículas, quando aplicadas topicamente, não comprometem a visão, o que está diretamente relacionado a dimensão das partículas empregadas. Neste contexto, de acordo com Hsu (2007), as micropartículas são mais vantajosas que as nanopartículas, uma vez que as últimas permanecem suspensas na cavidade vítrea e, por isso, frequentemente são associadas ao embaçamento da visão, enquanto que as micropartículas se sedimentam e não comprometem a transparência do humor vítreo (DEL AMO et al., 2008).

Quando comparado aos colírios convencionais, que são rapidamente drenados, as micropartículas podem aumentar o tempo de residência do fármaco encapsulado tanto na superfície ocular, como nas estruturas internas. (PIGNATELLO et al., 2002). Além disso, diversos estudos têm associado esses sistemas à liberação prolongada de fármacos na córnea (KOMPELLA et al., 2003; SAINSHIN et al., 2003; AYALASOMAYAJULA; KOMPELLA, 2005). Essas características favorecem não só uma maior biodisponibilidade local, mas também a

redução da frequência de instilação (VANDERVOORT; LUDWIG, 2007) e o desenvolvimento de formulações contendo menor concentração do fármaco. Menores concentrações de fármaco na formulação podem favorecer a minimização dos efeitos tóxicos sistêmicos ou locais em comparação aos sistemas convencionais que utilizam altas concentrações de fármacos (PIGNATELLO et al., 2002; LIU et al., 2008).

Além dessas características, as micropartículas podem fornecer ao fármaco proteção tanto enzimática (VANDERVOORT; LUDWIG, 2007), quanto da degradação física, química ou biológica (DATE et al., 2007), particularmente importante em nosso estudo. Além de possibilitar, quando necessário, a eliminação de incompatibilidades entre dois ou mais ativos e, no caso de fármacos administrados por via oral, o mascaramento do sabor desagradável (AHMAD et al., 2011; THOMPSON et al., 2007).

Após a administração tópica ocular, a liberação do fármaco da micropartícula pode ser iniciada tanto pela degradação ou erosão da partícula, quando são utilizados polímeros biodegradáveis, quanto pela difusão através da matriz, quando se tratam de polímeros inertes (PIGNATELLO et al., 2002). Para a administração tópica ocular, destaca-se a utilização de polímeros biodegradáveis, sendo a quitosana um dos mais estudados (RODRIGUES et al., 2009; GRATIERI et al., 2010).

De origem natural, a quitosana é um polímero facilmente obtido através da desacetilação da quitina, componente estrutural da casca de crustáceos, cutícula de insetos e da parede de alguns fungos e microrganismos (KAO et al., 2006; SHAH et al., 2008). Além de biodegradável e biocompatível, a quitosana é hidrofílica (SHAH et al., 2008), apresenta excelente compatibilidade com a superfície do olho e seu uso é aprovado pelo FDA (RODRIGUES et al., 2009). Para a administração tópica ocular de fármacos na córnea, duas características apresentadas pela quitosana merecem especial atenção: a presença de grupamentos amina (MAKHLOF et al., 2008) e suas características de promotora de absorção (DI COLO et al., 2008).

Na estrutura química da quitosana (Figura 7) estão presentes grupamentos amina carregados positivamente que podem interagir com os resíduos negativos da camada de muco, presente na superfície ocular, conferindo propriedades mucoadesivas (MAKHLOF et al., 2008), o que favorece o aumento do tempo de

contato do ativo com a superfície ocular. Por outro lado, as cargas positivas podem provocar uma reorganização estrutural das proteínas presentes nas membranas celulares, o que favorece a permeação do fármaco pela rota intracelular (SCHIPPER et al., 1997). De acordo com Dodane et al. (1999), a quitosana atua como promotora de absorção tanto pela rota intracelular, quanto pela rota intercelular, o que ocorre de maneira reversível e sem afetar a viabilidade celular.

Figura 7: Estrutura química da quitosana em baixo pH (Adaptado de Selimot et al., 2013).

Atualmente, estão descritos na literatura diversos métodos para a preparação das micropartículas, dentre eles o *spray drying* (STHAL et al., 2002; DEPRETER e OWENS et al., 2006; GELFUSO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009). Esta técnica é muito utilizada na área farmacêutica destacando-se pela encapsulação, formação de complexos e polimerização em um passo único e simples, trazendo como vantagens a rapidez no processo (GENC et al., 2006), a possibilidade de modular características físico-químicas dos pós resultantes, além da flexibilidade e do potencial de transposição de escala e do baixo custo (TEWA-TAGNE et al., 2007).

Micropartículas de insulina são preparadas há alguns anos com sucesso através da técnica do *spray drying* (STHAL et al., 2002; DEPRETER e OWENS et al., 2006; MALTESEN et al., 2008; AMIGHI, 2010; SANDRZADEH et al., 2010; BOWEY et al., 2012). De acordo com alguns autores, a temperatura do ar de saída da câmara de secagem é o ponto crítico para garantir a estabilidade do fármaco ao término da produção (STHAL et al., 2002; SANTOS et al., 2003; SANDRZADEH et al., 2010). Temperatura essa que deve ser mantida inferior a 120°C, com o intuito de

evitar o processo de degradação da insulina e, conseqüentemente, a formação de seus produtos de degradação (STHAL et al., 2002).

Apesar de existirem na literatura diversos estudos com formulações de nano/micropartículas de insulina para administração oral (SOCHA et al., 2009; COZAR-BERNAL et al., 2011) e pulmonar (DEPRETER et al., 2012) com comprovada permanência da sua atividade mesmo após a encapsulação, não existem relatos, até o momento, da produção de micropartículas de insulina para o tratamento tópico de lesões oculares e/ou para a síndrome do olho seco.

2.5.2. Gel termorreversível

Atualmente, com o intuito de contrapor as limitações relacionadas ao uso dos colírios aquosos convencionais, têm sido desenvolvidos sistemas de liberação que aumentem o tempo de residência do fármaco na superfície ocular, o que é obtido, por exemplo, com a utilização de pomadas e géis (LEE et al., 1986; GRATIERI et al., 2010; ABELHA et al., 2012). Entretanto, estes sistemas apresentam algumas desvantagens que limitam a adesão dos pacientes ao tratamento. As pomadas, por exemplo, são oleosas, “embaçam” a visão e são de difícil aplicação. Alguns autores relatam que, assim como as pomadas, os géis também são difíceis de serem administrados (EDSMAN et al., 1998; SIMAMORA et al., 1998).

Neste contexto, o desenvolvimento dos géis termorreversíveis *in situ* pode ser uma estratégia para favorecer a terapêutica, pois são de fácil administração e possibilitam uma cobertura rápida e completa da superfície ocular (LE BOURLAIS et al., 1998). Em temperatura ambiente esses hidrogéis encontram-se na fase líquida, como colírios usuais, e ao entrar em contato com o olho se geleificam devido a alterações físico-químicas (NANJAWADE et al., 2007; YIN et al., 2010). Essa transição para a forma de gel pode acarretar aumento do tempo de retenção da formulação na superfície do olho e, conseqüentemente, do fármaco, já que aumenta a força mecânica e reduz a perda pela drenagem lacrimal (KIM et al., 2002; GRATIERI et al., 2010).

Além disso, os géis termorreversíveis podem atuar como sistemas de liberação. Constituídos por polímeros hidrofílicos com capacidade de absorver grande quantidade de água e intumescer, no entanto, sem alterar a sua estrutura tridimensional, os hidrogéis permitem a difusão de substâncias pra dentro e pra fora

de sua estrutura, o que possibilita a sua utilização como sistema de liberação de fármacos (ANUMOLU et al., 2009; YIN et al., 2010). Por constituírem sistemas de liberação, propiciam tanto a redução da frequência de instilação, o que favorece a adesão dos pacientes ao tratamento, quanto o desenvolvimento de formulações com menor quantidade de ativo, reduzindo assim a toxicidade ocular (PIGNATELLO et al., 2002; LIU et al., 2008) e os gastos com a produção. De acordo com Le Bourlais et al. (1998), os géis termorreversíveis *in situ* propiciam, ainda, dosagens exatas e reprodutíveis.

Para o desenvolvimento de formulações tópicas termorreversíveis destinadas à aplicação ocular, tem sido utilizado com frequência o poloxamer 407 (WEI et al., 2002; MAYO et al., 2008; GRATIERI et al., 2010), tensoativo sintético, não tóxico, anfifílico e não iônico (WEI et al., 2002). Este polímero forma micelas em solução aquosa que podem formar um gel viscoso, dependendo da temperatura e da concentração do polímero empregada (JUHASZ et al., 1989). No entanto, a principal desvantagem do gel constituído por poloxamer é a baixa força mecânica, o que leva à rápida erosão (EL KAMEL et al., 2002). Desta forma, com o intuito de contornar esse problema, a associação com outros polímeros tem sido muito utilizada (LIN et al., 2004; QI et al., 2007).

Neste sentido, em 2010 foi desenvolvido e caracterizado com sucesso, em nosso laboratório, um gel polimérico binário, constituído por poloxamer 407 e quitosana para a veiculação ocular de fluconazol. Este sistema apresentou um maior tempo de residência na córnea, *in vivo*, quando comparado a uma solução isotônica comum (colírio), além de temperatura de geleificação adequada, propriedades mucoadesivas favoráveis e melhores parâmetros mecânicos (GRATIERI et al., 2010). O que nos fez pensar também na utilização deste sistema para a veiculação da insulina tópica ocular, direcionada tanto para o tratamento de SOS, como das lesões na córnea.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Preparar formulações contendo insulina, adequadas para a administração tópica ocular, e verificar a influência dessas formulações no distúrbio das glândulas lacrimais e na regeneração da córnea em ratos diabéticos.

3.2. Metas

- Obter e caracterizar as micropartículas de quitosana contendo insulina, através da técnica do *spray drying*;
- Obter e caracterizar o gel termorreversível *in situ* de quitosana e poloxamer contendo insulina;
- Obter e caracterizar o gel termorreversível *in situ* contendo as micropartículas com quitosana/insulina;
- Realizar o tratamento *in vivo* com a aplicação das formulações contendo ou não insulina nos ratos diabéticos;
- Verificar a produção do fluido lacrimal antes, durante e após o tratamento *in vivo*;
- Quantificar a insulina na glândula lacrimal, globo ocular e no sangue periférico;
- Realizar a análise citológica da superfície ocular, após o tratamento *in vivo*;
- Realizar a análise histológica do globo ocular, a fim de mensurar a espessura da córnea, após o tratamento *in vivo*.

4. METODOLOGIA ENVOLVIDA

4.1. Método analítico para a quantificação da insulina

Foi utilizada a técnica do ELISA para a quantificação da insulina biologicamente ativa presente tanto nas formulações, quanto nos tecidos a serem analisados (glândula lacrimal, globo ocular e sangue periférico), conforme realizado por Sajeesh e Sharma, 2006a; Sajeesh e Sharma, 2006b. Para tal, foi empregado o kit de ELISA comercial (Invitrogen™, EUA) específico para insulina humana recombinante, com leitura em 450 nm utilizando o leitor de placa de ELISA (Multiskan™ FC, Thermo Scientific, EUA).

Todo o procedimento foi realizado conforme descrito pelo fabricante, o qual corresponde à técnica do ELISA direto ou “*sanduíche*”. O kit dispõe de todos os reagentes necessários para a realização das análises, desde os padrões e controles internos, até o anticorpo conjugado a enzima, o cromógeno, a solução de limpeza e de parada. Além disso, as placas de 96 poços já vêm de fábrica pré-sensibilizadas, ou seja, impregnadas com o anticorpo anti-insulina.

Para as análises propriamente ditas, foram adicionados 50 μL dos padrões, controles ou amostras em cada poço, em duplicata, seguida da adição de 50 μL do anticorpo anti-insulina ligado a enzima, no caso, a peroxidase. A placa foi imediatamente incubada por 30 minutos com agitação contínua. Em seguida, todo o material foi aspirado e foi realizada a lavagem com a solução de limpeza disponível no kit, etapa que foi repetida por três vezes. Após foi adicionado 100 μL do cromógeno, no caso a tetrametilbenzidina, e a placa incubada por até 15 minutos em agitação contínua, na ausência de luz. Ao término, foi adicionado 100 μL da solução de parada (solução *Stop*) e, imediatamente, realizada a leitura em 450 nm.

Apesar de se tratar de um método previamente validado pelo fabricante do kit, antes do início dos experimentos foram realizadas as análises de especificidade (veículos utilizados no preparo das formulações e tecidos), linearidade, precisão e exatidão, seguindo a metodologia do ICH (2005).

4.2. Obtenção das micropartículas de quitosana contendo insulina pela técnica do *spray drying*

As micropartículas foram obtidas pela técnica do *spray drying* de acordo com o realizado por Gelfuso et al. (2011), ou seja, a partir de uma solução de 1% de quitosana com posterior incorporação da insulina. Detalhadamente, 1,0 g de quitosana foi solubilizado em 100 mL de uma solução aquosa de ácido acético 1% (v/v). A solução foi mantida em agitação até a sua completa solubilização e, em seguida, mantida em geladeira por uma noite (Fase A). Objetivando a concentração final de insulina de 1 UI/mL, 3,5 mg de insulina humana recombinante, correspondente a 100 UI, foram lentamente incorporados à Fase A e mantidos sob agitação e ao abrigo da luz. A solução final foi imediatamente aspergida no Spray Dryer (MSD 0.5, Labmaq®, Brasil) a um fluxo de 6,0-6,5 mL/min através de um bico atomizador pressurizado de 1,0 mm de diâmetro, com ar de atomização a 6 m³/min. A temperatura de entrada foi de 100°C e a temperatura de saída do ar foi de 75-85°C.

Para a obtenção da micropartícula branca, sem a adição da insulina, o processo realizado foi o mesmo. No entanto, 1,0 g de quitosana foi solubilizado em

100 mL de uma solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) e, em seguida, secado por *spray drying* sob as mesmas condições descritas acima.

4.2.1. Caracterização das micropartículas de quitosana/insulina

4.2.1.1. Rendimento do processo de produção (R%)

As micropartículas obtidas por *spray drying* foram tamisadas, em tamis de malha 63, pesadas e o rendimento do processo foi calculado de acordo com a porcentagem de sólidos adicionados no processo de preparação, segundo Parikh et al. (2003). Para tal, foi utilizada a Equação (1):

$$R\% = \left(\frac{Q_f}{Q_i} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde, R% é o rendimento do processo, Q_i é a quantidade de sólidos (quitosana mais insulina ou somente quitosana, no caso das micropartículas brancas) inicialmente adicionados para a preparação das micropartículas e Q_f é a quantidade de micropartículas obtidas no final do processo de produção.

4.2.1.2. Quantidade de insulina presente no pó resultante (INS%)

Foi determinada a quantidade de insulina total presente nas micropartículas. Para tal, 10 mg do pó contendo as micropartículas foram dispersos em 10 mL de uma solução aquosa de ácido acético 1% (v/v), sob agitação constante a 500 rpm, durante 24 horas. Em seguida, a solução foi mantida em banho de ultrassom (Ultra Cleaner 1400 - Unique®, Brasil) por 30 minutos e filtrada. A insulina foi quantificada pela técnica do ELISA, utilizando o kit comercial de ELISA, conforme descrito no item 4.1. Desta forma, a solução resultante foi diluída com o intuito de permanecer dentro dos limites da curva de calibração do ELISA, gerando um fator de correção. A partir de então, a porcentagem total de insulina nas micropartículas, produzidas por *spray drying*, foi calculada pela Equação (2):

$$INS\% = \left(\frac{Q_o}{Q_t} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde, INS% é a porcentagem de insulina nas micropartículas produzidas, Q_o é a quantidade de insulina presente nas micropartículas e detectada através do ELISA (já ajustado o fator de correção da diluição da amostra), e Q_t é a quantidade teórica de insulina inicialmente adicionada para preparar as micropartículas.

4.2.1.3. Tamanho das micropartículas

A distribuição do tamanho das partículas foi determinada pela difração de raio laser usando o difratômetro (LS13320, Beckman Coulter®, EUA). Para isso, 1 mg das micropartículas, contendo ou não insulina, foram dispersas em 2 mL de metanol e, imediatamente, analisadas no aparelho, conforme Oliveira et al. (2006) e Gelfuso et al. (2011).

4.2.1.4. Morfologia

A morfologia das micropartículas foi observada por microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para isso, amostras em triplicata, das micropartículas contendo ou não insulina, foram revestidas com ouro e analisadas no microscópio Phillips XL 30 FEG, com aceleração de voltagem de 20.0 kV, e ampliações de 3.000 a 20.000 vezes.

4.2.1.5. Potencial zeta

Para a análise do potencial zeta foi utilizada a dispersão contendo as micropartículas com e sem insulina, equivalente à utilizada *in vivo* para administração tópica ocular, ou seja, as micropartículas de quitosana/insulina, ou somente de quitosana, foram dispersas em uma solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), com concentração final de 1 UI/mL de insulina, no caso das partículas contendo insulina. O potencial zeta das micropartículas foi determinado utilizando o Zetasizer Nano ZS 4,0 (Malvern®, Reino Unido).

4.3. Obtenção do sistema geleificante *in situ* de quitosana e poloxamer contendo insulina

O processo de obtenção do gel termorreversível *in situ* foi realizado baseado no proposto por Gratieri et al. (2010), com algumas modificações. Inicialmente 1,0 g de quitosana foi solubilizado em 100 mL de uma solução aquosa de ácido acético

0,5% (v/v), sob agitação constante. Em seguida, o pH foi ajustado com uma solução de NaOH 5 M até o pH $6,0 \pm 0,2$. Esta solução foi mantida sob refrigeração por uma noite, para a completa dispersão (Fase A). Objetivando a concentração final de insulina de 1 UI/mL, 3,5 mg de insulina, correspondente a 100 UI, foi incorporado a solução de quitosana 1% (Fase B). Em seguida, 16 g de poloxamer foi lentamente adicionado, sob agitação constante e banho de gelo, à Fase B. O gel termorreversível *in situ* resultante foi mantido sob refrigeração e ao abrigo da luz.

Para a obtenção do gel termorreversível branco, sem a adição da insulina, o processo realizado foi o mesmo. No entanto, apenas 1,0 g de quitosana foi solubilizado em 100 mL de uma solução aquosa de ácido acético 0,5% (v/v), com ajuste do pH para $6,0 \pm 0,2$ e mantida sob refrigeração durante uma noite. Posteriormente, foi incorporado ao gel de quitosana, sob banho de gelo, 16 g de poloxamer, aos poucos, e sob agitação intensa. O gel termorreversível *in situ* resultante foi armazenado sob refrigeração.

4.3.1. Caracterização do gel termorreversível *in situ*

4.3.1.1. Osmolalidade e pH

A osmolalidade do gel termorreversível *in situ*, contendo ou não insulina, foi determinada pelo método do ponto de congelamento. Para tal, 150 μ L de cada amostra, em triplicata, foram analisadas, pelo método direto, sem diluição, utilizando o Osmômetro (Semi-Micro K-7400, KNAUER, Alemanha). A osmolalidade da solução contendo somente quitosana 1% e do gel contendo somente poloxamer 16% também foi verificada.

O pH do gel termorreversível *in situ*, com e sem insulina, foi determinado em triplicata, através da diluição de 1:10 em água deionizada. A leitura foi realizada com o auxílio do pHmetro (DM20, Digmed®, Brasil).

4.3.1.2. Potencial zeta

O gel termorreversível *in situ* contendo a insulina foi diluído 1:10 em água deionizada. A formulação empregada para a análise foi equivalente à utilizada *in vivo* para administração tópica ocular, com concentração final de 1 UI/mL de insulina. Desta forma, o potencial zeta foi determinado utilizando o Zetasizer Nano ZS 4,0 (Malvern®, Reino Unido).

4.4. Obtenção do sistema geleificante *in situ* de quitosana e poloxamer contendo as micropartículas

As micropartículas com quitosana/insulina produzidas por *spray drying* foram incorporadas ao gel termorreversível *in situ*, constituindo uma formulação com dois sistemas de liberação distintos. Para tal, foi primeiro preparado 100 mL da solução de quitosana 1%, com o ajuste do pH, conforme descrito no item 4.3. Em seguida foram incorporadas as micropartículas contendo o equivalente a 100 UI/mL de insulina, objetivando a concentração final de 1 UI/mL de insulina. A solução de quitosana contendo as micropartículas foi mantida sob refrigeração por uma noite, ao abrigo da luz. Posteriormente, 16,0 g de poloxamer foi lentamente adicionado, sob agitação constante e banho de gelo. O gel termorreversível *in situ* resultante foi mantido sob refrigeração e ao abrigo da luz.

A osmolalidade, o pH e o potencial zeta também foram investigados para o gel termorreversível *in situ* contendo as micropartículas quitosana/insulina, de maneira idêntica ao realizado para o gel contendo somente a insulina (item 4.3.1.).

4.5. Formulações avaliadas no estudo *in vivo*

Durante o estudo *in vivo*, foram utilizadas quatro formulações contendo 1 UI/mL de insulina, sendo estas:

- a) Dispersão simples com insulina (DISP INS);
- b) Dispersão das micropartículas contendo insulina (DISP MP INS);
- c) Gel termorreversível *in situ* com insulina (Gel INS);
- d) Gel termorreversível *in situ* contendo as micropartículas com insulina (Gel MP INS).

A dispersão simples com insulina foi preparada dispersando-se 3,5 mg dos cristais de insulina humana recombinante, em 100 mL de uma solução de NaCl 0,9% estéril. A dispersão das micropartículas contendo insulina foi preparada dispersando-se 4,526 mg das micropartículas, obtidas de acordo com o item 4.2., em 100 mL de solução de NaCl 0,9 % estéril. O gel com insulina e com as micropartículas com insulina, foram preparados como descrito nos itens 4.3 e 4.4., respectivamente.

A dispersão de micropartículas e o gel termorreversível *in situ* também foram preparados na ausência de insulina, gerando duas formulações brancas, que também foram utilizadas nos estudos *in vivo*, sendo estas:

- e) Dispersão das micropartículas sem insulina (DISP MP s/INS);
- f) Gel termorreversível *in situ* sem insulina (Gel s/INS).

4.6. Estudos *in vivo* com as preparações a base de insulina para o tratamento da síndrome do olho seco e lesões na córnea

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 6 a 8 semanas (180-220 g de massa corpórea, em média), adquiridos do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em conformidade com as normas éticas estabelecidas pela CEUA (Protocolo de aprovação: 12.1.915.53.3).

Para provocar as alterações a serem tratadas, síndrome do olho seco e lesões na córnea, foi induzido o *diabetes mellitus* em 35 animais, conforme descrito no item 4.6.1. Os animais diabéticos foram divididos em sete grupos, com cinco animais cada. Destes um grupo não sofreu tratamento algum (controle negativo), dois grupos foram tratados com as formulações sem insulina (DISP MP s/INS e Gel s/INS) e quatro grupos foram tratados com as formulações contendo insulina (DISP INS, DISP MP INS, Gel INS, Gel MP INS). Além disso, um grupo de cinco animais foi mantido saudável, sem diabetes (controle positivo) (Figura 8).

Figura 8: Representação esquemática dos grupos de animais utilizados nos experimento *in vivo*.

4.6.1. Indução do *diabetes mellitus*

Para a indução do *diabetes mellitus*, os animais, previamente mantidos em jejum de oito horas, foram tratados com uma dose única de estreptozotocina (STZ), 60 mg/Kg de peso corporal, diluída em 1 mL de tampão citrato 0,01 mol/L, administrada pela veia caudal. O grupo controle positivo, não diabético, foi tratado somente com o tampão citrato, também pela veia caudal.

Após dois dias da indução, a comprovação do DM tipo 1 foi realizada com o auxílio do aparelho medidor de glicose (Accu-check Active) e fitas para glicemia de mesma marca, mediante amostragem de sangue a partir da veia caudal. A presença da patologia foi considerada quando os níveis séricos de glicose, em jejum, foram superiores a 200 mg/dL (MODULO et al., 2009).

4.6.2. Tratamento com as formulações

O tratamento foi iniciado oito semanas após a comprovação da indução do *diabetes mellitus*, período necessário para provocar alterações na superfície da córnea e a redução da produção do fluido lacrimal (MODULO et al., 2009). Durante o tratamento foi instilado 50 µL da formulação, contendo ou não insulina, em cada olho, uma vez ao dia, durante 15 dias.

4.6.3. Variação de peso corpóreo e glicemia capilar

Foi realizada a checagem do peso corpóreo e da glicemia capilar em três tempos distintos: antes da indução do diabetes, antes do início do tratamento (Dia 0) e no término do tratamento (Dia 15). Para o peso corpóreo foi utilizada, em todos os tempos, a mesma balança analítica (AS 2000C, Marte, Brasil). Já para a determinação da glicemia capilar, foi realizada a punção, a partir da veia caudal dos animais, e a concentração de glicose no sangue foi determinada com o auxílio do glicosímetro (Accu-check Active®, Roche, Suíça), previamente calibrado, e fitas para glicemia capilar de mesma marca.

4.6.4. Análise da secreção de lágrimas – teste do fenol vermelho

O teste do fenol vermelho (RPT ou “*Red Phenol Test*”) foi realizado nos dias 0, 5, 10 e 15 de tratamento, antes da instilação das formulações, em todos os animais, em ambos os olhos, com o intuito de verificar a produção de fluido lacrimal

pela glândula. Para tal, o cordão de RPT (Zone-Quick®, Showa Yakuhiin Kako Co. Ltda, Japão), de aproximadamente 20 mm de comprimento, foi colocado na porção inferior da pálpebra, sem anestesia, e mantido em contato com cada olho durante 30 segundos. Em seguida, através da mudança de cor apresentada, a quantidade umedecida do cordão foi medida em milímetros, com o auxílio de um paquímetro.

4.6.5. Citologia de impressão da córnea

Após 15 dias de tratamento, antes do sacrifício, os animais foram anestesiados (ketamina: 120 mg/kg de peso e xilazina: 12 mg/kg de peso) e, em seguida, foi realizada a citologia de impressão. Para tal, as amostras das células do epitélio da córnea foram coletadas com papel de filtro com 45 µm de porosidade (Millipore, EUA). Os papéis foram cortados em quadrados de 1,0 cm de lado e mantidos em contato com cada olho durante 30 segundos. Em seguida, foram submetidos à coloração com ácido periódico de Schiff (PAS, “*Periodic acid-Schiff*”) e contra-coradas com hematoxilina, conforme realizado por Modulo et al. (2009).

Para a coloração foi utilizado o kit específico de PAS (Sigma Aldrich®, EUA), o qual dispõe da solução de hematoxilina, solução de ácido periódico 0,5% e o reagente de Schiff. Ainda, fora do kit, foi preparada a solução fixadora (100 mL de álcool etílico 70%, 5 mL de ácido acético glacial, 5 mL de formaldeído 37%) e a solução de metabissulfito de sódio 0,5% (m/v), além da bateria de álcool etílico com graduações distintas (50%, 70% e 90%).

Imediatamente após a coleta das células cada papel de filtro foi colocado dentro de um cassete e mantido por 10 minutos na solução fixadora descrita acima. Em seguida os cassetes foram transferidos para o álcool etílico 70%, onde permaneceram por até 24 horas. Iniciando a coloração propriamente dita, o material foi imerso por 20 vezes em água da torneira, seguida de 20 vezes em água destilada. Após, foram mantidos durante cinco minutos na solução de ácido periódico 0,5%, seguida da imersão por mais 20 vezes em água destilada. Os cassetes foram transferidos para o reagente de Schiff, permanecendo por cinco minutos, seguida da imersão por mais 20 vezes em água destilada. Logo após foram imersos em solução de metabissulfito de sódio 0,5% por dois minutos, seguida de 20 vezes na água destilada. As amostras permaneceram por um minuto imersas na solução de hematoxilina, seguida por mais 20 vezes na água destilada. Após,

iniciou-se o processo de desidratação, no qual os cassetes foram mantidos por dois minutos em cada um dos alcoóis etílico 50%, 70%, 90% e absoluto. Em seguida, o processo foi finalizado com a imersão, durante três minutos, em xilol, em três passagens. Após, o papel de filtro foi retirado de dentro dos cassetes, com o auxílio de uma pinça, e as lâminas foram montadas com Permount.

As amostras foram analisadas em microscópio Primo Vert (Carl Zeiss GmbH, Alemanha) no aumento de 40 x e classificadas de 0 a 3, de acordo com a escala de Nelson adaptada que considera, respectivamente, epitélio saudável e com maior comprometimento celular, conforme descrito a seguir:

Grau 0: As células epiteliais são pequenas e redondas com citoplasma eosinofílico. O núcleo é grande e basófilo, com relação núcleo/citoplasma de 1:1 ou 1:2. Existe grande quantidade de células por campo.

Grau 1: As células epiteliais são um pouco maiores, mais poligonais e com citoplasma eosinófilo. O núcleo é menor, com relação núcleo/citoplasma de 1:3. Existe uma boa quantidade de células por campo.

Grau 2: As células epiteliais são grandes e poligonais. Ocasionalmente são multinucleadas e o citoplasma de coloração variável. O núcleo é menor com relação núcleo/citoplasma de 1:4 ou 1:5. Existe pouca quantidade de células por campo.

Grau 3: As células epiteliais são grandes, poligonais e com citoplasma basófilo. O núcleo é pequeno, picnótico ou ausente em algumas células. A relação núcleo/citoplasma é maior que 1:6. Rara quantidade de células por campo.

Para a análise qualitativa foi utilizado o parecer de dois pesquisadores distintos. Para tal, foram selecionados aleatoriamente seis campos de cada lâmina, sendo que os mesmos campos foram avaliados por ambos os pesquisadores, em uma análise duplo cego. Para o resultado final foi verificado o nível de concordância entre os dois pesquisadores, através do cálculo do kappa, que varia de -1 a +1, sendo respectivamente, menor e maior concordância (COHEN, 1960). Em seguida, o valor encontrado para o kappa foi classificado de acordo com a escala de Nigel Paneth, que julga uma concordância excelente acima de 0,80, bom entre 0,60 e 0,80, regular entre 0,40 e 0,60, e ruim < 0,40 (NIGEL et al., 2007).

4.6.6. Dosagem da insulina na circulação sanguínea

Ainda sob anestesia, antes do sacrifício, foi realizada a pulsão cardíaca em cada animal com o intuito de retirar o sangue total. O sangue coletado (aproximadamente, 1 mL) foi colocado em um tubo falcon, na ausência de anticoagulantes e mantido em temperatura ambiente até a formação do coágulo. Após duas horas, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos. O soro foi cuidadosamente coletado e analisado por ELISA para determinação da quantidade de insulina.

4.6.7. Recuperação da insulina na glândula lacrimal e no globo ocular

Para o sacrifício, os animais ainda anestesiados foram mantidos em câmara saturada de CO₂ por, aproximadamente, 10 minutos. Em seguida foi confirmada a morte pela ausência de movimentos respiratórios e de batimentos cardíacos.

A partir de então, as glândulas lacrimais e os globos oculares esquerdos foram removidos para o processamento e dosagem da insulina presente nos tecidos. Imediatamente após a remoção, as glândulas lacrimais foram pesadas e então imersas em 10 mL de uma solução de ácido clorídrico 0,01 M (v/v). Em seguida foram homogeneizadas em Ultra Turrax (T25 Basic, IKA®, Alemanha), na velocidade 5, a 24.000 rpm, durante um minuto, filtradas e quantificadas pela técnica do ELISA, para determinação da quantidade de insulina aí presente. O mesmo procedimento foi realizado para os globos oculares.

4.6.8. Análise da espessura do epitélio da córnea

Após o sacrifício os globos oculares direitos foram removidos para a análise histológica, visando à mensuração da espessura do epitélio da córnea. Com o intuito de favorecer a entrada da solução fixadora no interior do tecido, foi realizada uma pequena incisão nos mesmos com bisturi. Em seguida, os globos oculares foram mantidos em uma solução fixadora de PBS (tampão fosfato salino) com paraformaldeído 4%, durante 24 horas. Após, os tecidos foram embebido em OCT “compound” (Tissue-Tek O.C.T. compound, Sakura®, EUA) e, congelados em formato de bloco histológico com o auxílio de gelo seco e acetona. O material foi mantido em freezer -80 °C e, posteriormente cortado à 6 µm com um criostato (CM1850, Leica®, Alemanha). Os cortes foram fixados em lâminas de vidro

previamente gelatinizadas e, coradas com hematoxilina-eosina de Harris (HE). Em seguida o material foi analisado no microscópio Primo Vert (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha), no aumento de 40 x, e o software Axion Vision Release 4.8.2.0. (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha) foi empregado para a mensuração da medida da espessura do epitélio da córnea.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizados os testes: 1) Anova duas vias (2way), no estudo da produção de fluido lacrimal ao longo do tempo, pelo fato de existirem duas variáveis (tempo e fluido lacrimal) e a presença de amostras pareadas, e também para o estudo da variação de peso ao longo do tempo (tempo e peso) e da glicemia ao longo do tempo (tempo e glicemia); 2) Anova uma via (1way), nos estudos de recuperação da insulina na glândula lacrimal, no globo ocular e de dosagem na corrente sanguínea, uma vez que, em cada análise foi levada em consideração apenas uma variável (concentração de insulina). O mesmo teste foi utilizado nas análises da produção pontual de fluido lacrimal, no Dia 15 e da espessura do epitélio da córnea, ambos também com apenas uma variável; 3) teste “t de *student*” para análise pontual da glicemia capilar, antes e após a indução do *diabetes mellitus*, análise do peso da glândula lacrimal e análise pontual da produção de fluido lacrimal, no Dia 0, já que foi levado em consideração duas variáveis (diabéticos e não diabéticos). O mesmo teste foi utilizado para o tamanho da micropartícula com e sem insulina. Todos os cálculos foram realizados com o programa GraphPad Prism 5.0, apresentados como média $\pm$ EP e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para a citologia de impressão, foi realizada a análise estatística através do cálculo do kappa, seguida da classificação por Nigel Paneth, uma vez que, por se tratar de análise qualitativa, foi avaliado o nível de concordância entre dois pesquisadores, em ensaio duplo cego.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A insulina, por suas inúmeras ações sobre as células alvos, entre elas a regulação da homeostase da glicose e o crescimento e diferenciação celular, é reconhecida como um dos hormônios responsáveis pelo funcionamento adequado da secreção lacrimal e da integridade da superfície ocular (OLIVER et al., 1987;

SHANLEY et al., 2004; BERDAL et al., 2011; MODULO et al., 2009). Embora os mecanismos de ação detalhados sejam desconhecidos, a presença dos receptores da insulina na superfície ocular, na glândula lacrimal, assim como a presença do próprio hormônio e dos seus fatores de crescimento, na região anterior do olho, reforçam a ação local da insulina (ROCHA et al., 2000; ROCHA et al., 2002; MODULO et al., 2009; YU et al., 2010; ABDELKADER et al., 2011) e sugerem seu potencial no tratamento da síndrome do olho seco e de lesões na córnea.

Apesar de o tratamento tópico localizado ser extensivamente utilizado em complicações oculares, a utilização de soluções aquosas simples apresentam diversas limitações, como a lacrimação, a diluição do fármaco pela lágrima e a renovação da lágrima, resultando numa baixa biodisponibilidade do ativo (GHATE et al., 2008; GAUDANA et al., 2009). Atualmente não foram encontradas formulações tópicas contendo insulina para o tratamento da síndrome do olho seco e todas as formulações contendo o fármaco destinadas ao tratamento tópico de lesões na córnea são formulações aquosas simples (ZAGON et al., 2007; ALVES et al., 2008; WEI-LI, 2009; YU et al., 2010; BASTION e LING, 2013; HAMPEL et al., 2013), não sendo encontradas formulações elaboradas ou sistemas de liberação contendo a insulina visando à administração ocular tópica.

Sabe-se que o desenvolvimento de formulações e/ou sistemas de liberação adequados, que aumentem a biodisponibilidade local do fármaco, contrapondo a necessidade de altas dosagens e repetidas administrações é o grande desafio da atualidade para o tratamento de doenças no globo ocular (VANDERVOORT e LUDWIG, 2007). Desta forma, no presente trabalho, foram desenvolvidas formulações simples de uso tópico além de sistemas de liberação para aplicação ocular da insulina.

5.1. Formulações tópicas contendo insulina

5.1.1. Dispersão contendo insulina

Em 2004 foi patenteado pelo oftalmologista e pesquisador Dr. Eduardo Melani Rocha, colaborador deste trabalho, uma formulação simples de colírio a base de insulina (Patente nº. PI0401186-4), com características promissoras para o tratamento da síndrome do olho seco. Assim, no presente estudo, também foi

preparada uma formulação simples para a veiculação da insulina, considerada formulação controle dentre as formulações contendo o fármaco.

A insulina veiculada em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) resultou em uma dispersão ligeiramente opaca, com potencial zeta negativo de $-4,15 \pm 0,92$ mV, característico da molécula de insulina, que apresenta um residual de carga negativo (BRANGE et al., 1987). A formulação apresentou como vantagens o pH $6,0 \pm 0,2$ e a osmolalidade ($284,25 \pm 5,44$ mOsmol/kg) adequados ao tratamento ocular, próximos ao fisiológico (GREAVES et al., 1993a).

De fato, a veiculação da insulina em solução salina (NaCl 0,9%) vem sendo utilizada com sucesso para a aplicação tópica ocular visando o tratamento de lesões na córnea, tanto em estudos com animais (BARTLETT et al., 1994a; BARTLETT et al., 1994b; ZAGON et al., 2007), como em estudos clínicos em humanos (WEI-LI, 2009; BASTION e LING, 2013), devido a sua elevada compatibilidade ocular, sem apresentar toxicidade para a córnea e para a superfície do olho (BARTLETT et al., 1994a; BARTLETT et al., 1994b).

De acordo com Bartlett et al. (1994a) soluções aquosas contendo a insulina com concentração de 100 UI/mL, em dose única, não apresentam nenhuma toxicidade clínica para as estruturas do segmento anterior do olho dos animais tratados. O mesmo grupo de pesquisadores verificou que mesmo a exposição multi-dose da insulina ocular na concentração de 100 UI/mL era segura (BARTLETT et al., 1994b). Esses estudos reforçam a segurança das formulações desenvolvidas em nosso trabalho, as quais contiveram todas a mesma concentração de insulina, de 1 UI/mL, infimamente inferior a concentração das soluções estudadas por Bartlett et al.

5.1.2. Micropartículas de quitosana/insulina

A incorporação de ativos em sistemas dispersos de menor diâmetro oferece várias vantagens para a aplicação tópica ocular (KOMPELLA et al., 2003; AYALASOMAYAJULA e KOMPELLA, 2005; LIU et al., 2008; GUADANA et al., 2009). Além de constituírem sistemas de liberação prolongada do ativo que possibilitam um maior tempo de contato do fármaco com a superfície ocular, através da liberação sustentada a partir de micropartículas biocompatíveis (KOMPELLA et al., 2003; SAINSHIN et al., 2003; AYALASOMAYAJULA; KOMPELLA, 2005), esses sistemas possibilitam a redução da frequência de instilação (VANDERVOORT;

LUDWIG, 2007) e a confecção de formulações contendo menor concentração do ativo (PIGNATELLO et al., 2002; LIU et al., 2008).

A produção de micropartículas contendo insulina pode ser vantajosa, em particular a produção de micropartículas com quitosana que favorece ainda mais o tratamento tópico, devido às características mucoadesivas e promotoras de absorção da quitosana e a probabilidade de liberar a insulina de maneira sustentada. Desta forma, micropartículas de quitosana para veiculação da insulina foram produzidas por *spray drying*.

O rendimento do processo de produção das micropartículas sem e com insulina foi de $29,20 \pm 5,74\%$ e $37,29 \pm 6,27\%$, respectivamente. O rendimento razoável está relacionado com as características da quitosana e com a pequena escala usada na sua produção. Especificamente, a quitosana é um polímero que forma filmes fortemente aderentes, quando aspergidos sobre uma superfície lisa. Portanto, quando as gotículas da solução de quitosana foram pulverizadas e entraram em contato com a parede de vidro do *spray drying*, formaram um filme aderente, resultando em queda no rendimento do processo (JI et al., 2009; GELFUSO et al., 2011). De acordo com Maa et al. (1998), o baixo rendimento ocorre porque cerca de 10-20% das partículas menores que $2 \mu\text{m}$ se perdem na exaustão do ar, e de 20-30% das micropartículas de mesmo tamanho ficam aderidas no ciclone.

Apesar de razoável, o rendimento obtido no presente trabalho é compatível com outros estudos que também utilizaram como técnica o *spray drying* e como polímero a quitosana, visando à produção de micropartículas carreadoras de ativos em pequena escala. Desai e Park (2005), por exemplo, obtiveram rendimento de 42,13% e Huang et al. (2003) de 42,50%, carreando respectivamente acetaminofeno e betametasona; já Santos et al. (2003) obtiveram rendimento médio de 32,12% durante os seus estudos de otimização dos parâmetros de secagem por aspersão de micropartículas de quitosana como carreadores de insulina, destinadas para uso oral.

Mesmo com a desvantagem do rendimento, o método de secagem por aspersão, *spray drying*, foi escolhido, pois apresenta diversas vantagens, tais como a simplicidade de obtenção das micropartículas já secas em um passo único, a reprodutibilidade alcançada de lote em lote, a baixa quantidade de solvente

necessária e a facilidade de transposição de escala (CEVHER et al., 2006). Além disso, sabe-se que esta perda de material é mais significativa quando pequenas quantidades de formulações são atomizadas (GRATIERI et al., 2010; GELFUSO et al., 2011). O que justifica os resultados encontrados, já que até então o volume utilizado para o preparo das micropartículas foi de 100 mL/formulação, escala laboratorial.

A quantidade de insulina presente no pó recuperado, ou seja, presente nas micropartículas preparadas foi de $77,34 \pm 6,32\%$ da quantidade inicial de fármaco aspergido. A grande porcentagem de fármaco presente nas micropartículas pode estar relacionada às cargas opostas apresentadas pela insulina e quitosana (ELSAYED et al., 2010). O polímero de quitosana apresenta carga residual positiva, devido aos grupamentos amino e a insulina residual negativo, proveniente dos grupamentos ácidos, o que favorece as forças de atração entre as moléculas (CHAUNDHURY e DAS, 2010; WU et al., 2011), contribuindo para a alta quantidade de insulina presente no pó resultante.

Resultado semelhante foi encontrado por Varshosaz et al. (2004) e por Elsayed et al. (2010), que alcançaram, respectivamente, 65 e $78,81 \pm 0,68\%$ de eficiência de encapsulação, ambos utilizando o método de complexação de polieletrólitos para confecção de microesferas e nanopartículas de quitosana e insulina, respectivamente.

A Figura 9 mostra a distribuição do tamanho das micropartículas obtidas. Para a análise do tamanho das partículas as amostras foram dispersas em metanol, solvente que inibe a agregação e o intumescimento das micropartículas de quitosana, possibilitando assim uma análise mais precisa do real tamanho apresentado pelos sistemas microparticulados (OLIVEIRA et al., 2006). No presente trabalho o diâmetro médio obtido foi de $4,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$ e $4,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$, para as micropartículas sem e com insulina, respectivamente.

Figura 9: Distribuição do diâmetro das micropartículas por difração de raio laser. A) micropartícula sem insulina; B) micropartícula com insulina.

O tamanho obtido apresenta compatibilidade para a administração tópica ocular, sem causar embaçamento visual (DEL AMO et al., 2008; GUADANA et al., 2009; BIN CHOY et al., 2008), uma vez que se sedimentam e não comprometem a transparência do humor vítreo (DEL AMO et al., 2008). Além disso, de acordo com Kaur et al. (2004) e Bin Choy et al. (2008), sistemas microparticulados cujo diâmetro não ultrapasse os 10 μm ficam retidos no saco lacrimal, o que permite que o fármaco continue sendo liberado na superfície ocular, sem causar desconforto ao paciente. Característica que possibilita também o aumento do tempo de contato do ativo, no caso a insulina, na superfície da córnea, ou seja, no sítio de ação, o que pode favorecer o tratamento tanto das lesões na córnea, como da síndrome do olho seco.

Comparando o tamanho apresentado pelas micropartículas sem e com insulina, pode-se observar que houve uma ligeira redução devido à incorporação do fármaco, no entanto, sem diferença estatística (“t de *student*”, $p > 0,05$). Resultado inverso ao encontrado por Santos et al. (2003), cujas micropartículas sem e com insulina apresentaram, respectivamente, $4,05 \pm 0,08$ e $5,62 \pm 0,03$ μm . No entanto, acredita-se que a presença de carga residual opostas apresentada pela insulina (negativa) e quitosana (positiva), proporcionaram maior força de atração intermolecular (ELSAYED et al., 2010), o que contribuiu para a redução do diâmetro das micropartículas que contém o fármaco.

Na Figura 10, observa-se a morfologia dos cristais de insulina e das micropartículas branca (sem insulina) e contendo o fármaco.

Figura 10: Fotomicrografia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A e B) cristais de insulina humana recombinante, no aumento de 3.00 Kx e de 10.00 Kx, respectivamente; C e D) micropartícula sem insulina, no aumento de 3.00 Kx e de 20.00 Kx, respectivamente; E e F) micropartícula com insulina, no aumento de 3.00 Kx e de 20.00 Kx, respectivamente.

De acordo com a Figura 10 A-B, os cristais de insulina apresentaram conformação hexagonal, com tendência a aglomeração. Com uma busca visual, por diversos campos, não foi verificada a presença destes cristais fora das micropartículas, o que leva a crer que toda a insulina presente no pó resultante

esteja dentro das micropartículas. Porém, mais análises são necessárias para confirmar esse achado.

Em relação a Figura 10 C-F, pode-se verificar que as micropartículas produzidas apresentaram um diâmetro de aproximadamente $4,5\pm0,4\ \mu\text{m}$ e $3,8\pm0,7\ \mu\text{m}$, sem e com insulina, respectivamente, o que está de acordo com os tamanhos de partícula encontrados com o método de difração a laser (Figura 9).

No que diz respeito à morfologia, tanto as micropartículas com, como as sem insulina, apresentaram uma superfície razoavelmente esférica e não porosa, sem ranhuras ou fissuras, compatível com a administração tópica ocular (BIN CHOY et al., 2008), porém com uma aparência escamosa. De acordo com Gelfuso et al. (2011), essa aparência escamosa é decorrente da deposição do polímero, no caso a quitosana, sobre a superfície das partículas, que no entanto, não interfere na performance do sistema microparticulado.

Não foi observada diferença na morfologia das micropartículas sem (Figura 10 C-D) e com insulina (Figura 10 E-F), o que pode estar relacionado à pequena quantidade do hormônio incorporado durante o processo produtivo (3,5 mg de insulina em 100 mL de solução, correspondente a 1 UI/mL). De acordo com Santos et al. (2003), a incorporação da insulina ao sistema microparticulado também não foi capaz de alterar significativamente a forma das partículas, sendo observado apenas uma ligeira redução da rugosidade.

Após a caracterização das micropartículas, esse sistema foi utilizado para a preparação de três formulações diferentes para aplicação tópica ocular, duas contendo a insulina e uma sem o fármaco, sendo elas:

- a) Dispersão contendo as micropartículas com insulina;
- b) Gel contendo as micropartículas com insulina;
- c) Dispersão contendo as micropartículas sem insulina.

As dispersões das micropartículas, com ou sem insulina, foram preparadas por simples dispersão das partículas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Estas dispersões apresentaram pH $6,0\pm0,2$ e potencial zeta de $+11,48\pm0,89$ e $+13,76\pm0,39$ mV, respectivamente, na presença e na ausência da insulina. O potencial zeta positivo se deve, possivelmente, às cargas positivas apresentadas pela quitosana, polímero catiônico, que possui pKa $\sim 6,5$ (GRIBANOV e SAZANOV,

2008). Essas cargas positivas podem trazer vantagem ao sistema de liberação ocular, já que a superfície do olho possui residual negativo, o que favorece a interação formulação/superfície ocular, aumentando o tempo de residência do fármaco no olho (MAKHLOF et al., 2008; GRATIERI et al., 2011).

A outra formulação estudada, o gel contendo as micropartículas, foi preparado pela dispersão das micropartículas no gel termorreversível de quitosana e poloxamer, cujas características estão descritas e discutidas a seguir.

5.1.3. Sistema geleificante *in situ* de quitosana e poloxamer contendo insulina

A utilização de géis para o tratamento ocular pode reduzir as limitações relacionadas ao uso dos colírios aquosos convencionais, uma vez que, prolongam o tempo de contato da formulação com a superfície ocular (KAUR et al., 2002; GRATIERI et al., 2011), diminuem a frequência de aplicação e favorecem a adesão dos pacientes ao tratamento (SCHOENWALD, 1990). No entanto, a maior queixa associada aos géis e pomadas com finalidade ocular é a dificuldade de aplicação, devido a sua viscosidade (SIMAMORA et al., 1998).

Como alternativa, os géis termorreversíveis *in situ* são de fácil administração, já que em temperatura ambiente encontram-se na fase líquida, como colírios usuais, e ao entrar em contato com o olho se geleificam devido a alterações físico-químicas na superfície ocular (NANJAWADE et al., 2007; YIN et al., 2010). Essa transição para a forma de gel na superfície ocular pode acarretar aumento do tempo de retenção da formulação e, conseqüentemente, do fármaco no olho (KIM et al., 2002; GRATIERI et al., 2010).

Neste sentido, em 2010 foi desenvolvido e caracterizado com sucesso, em nosso laboratório, um gel polimérico binário, constituído por quitosana e poloxamer 407 para a veiculação ocular de fluconazol (GRATIERI et al., 2010). No presente projeto, esse mesmo sistema que proporcionou maior tempo de residência do fluconazol na córnea, temperatura de geleificação adequada, propriedades mucoadesivas favoráveis e melhores parâmetros mecânicos, foi utilizado para incorporar a insulina livre e encapsulada em micropartículas.

A determinação da osmolalidade do gel é uma etapa importante no preparo de formulações oftálmicas. Formulações hipertônicas e hipotônicas podem acarretar reações de desconforto e irritação, levando a maior produção de fluido lacrimal, o

que pode diminuir ainda mais a biodisponibilidade da formulação. Preparações com osmolalidade inferior a 260 mOsm/Kg ou superior a 340 mOsm/Kg, dependendo do volume instilado, podem ser irritantes para os olhos (BOWMAN et al., 2009).

De acordo com a literatura, a quitosana não exerce influência sobre a osmolalidade final do gel (HOEMANN et al., 2007), no entanto, sabe-se que o poloxamer pode influenciar o comportamento osmótico da formulação, por isso deve ser levado em consideração. Portanto, a osmolalidade dos géis produzidos foi determinada por análise direta, sem a diluição das amostras. Técnica considerada eficaz para análise osmótica, por não haver necessidade de diluições e cálculos, sem consequente utilização de fator de correção (ABELHA et al., 2012).

Com a análise direta, pelo método do congelamento, amostras dos géis contendo quitosana 1% e poloxamer 16%, com e sem insulina, foram analisadas, em triplicata, assim como o gel contendo as micropartículas quitosana/insulina. A osmolalidade do gel somente com poloxamer 16% e da solução de quitosana 1% usada no preparo do gel também foram realizadas (Tabela 1).

Tabela 1: Osmolalidade dos géis e da solução de quitosana, com pH 6,0, pelo método direto

Amostra	Osmolalidade (mOsm/Kg)
Solução de quitosana 1%	133,67(±0,58)
Gel poloxamer 16%	185,0(±3,61)
Gel quitosana 1% + Poloxamer 16%	387,33(±3,51)
Gel quitosana 1% + Poloxamer 16% + Insulina 1UI/mL	371,67(±1,53)
Gel quitosana 1% + Poloxamer 16% + Micropartícula quitosana/insulina 1UI/mL	397,33(±2,89)

Os géis produzidos apresentaram osmolalidades ligeiramente superior ao limite preconizado (340 mOsm/kg). No entanto, de acordo com Bowman et al. (2009), após a aplicação de uma formulação na superfície ocular, a formulação se mistura ao fluido lacrimal e, desta forma a osmolalidade final é alterada. Ainda, de

acordo com Ludwig e Van Ooteghem (1987), a osmolalidade original do fluido lacrimal é reconstituída após cerca de um a dois minutos de aplicação da formulação não isotônica, o que depende do volume aplicado. Desta forma, levando em consideração a pequena quantidade veiculada por olho (50 μ L) e a frequência de instilação (1 vez ao dia), acredita-se que a formulação não exerça características irritantes.

O pH da formulação oftálmica de uso tópico também deve ser levado em consideração. Devido à baixa capacidade tamponante do filme lacrimal é desejável que o pH das formulações tópicas seja próxima ao fisiológico, que é 7,4 (VAN HAERINGEN, 1981). Todos os géis termorreversíveis *in situ* desenvolvidos neste trabalho apresentaram pH próximo a 6,0, após o ajuste. O ajuste do pH foi necessário devido a presença da quitosana. Esse polímero só é solúvel em meio ácido e em pH inferior a 6,3, abaixo do qual, é capaz de formar soluções viscosas destinadas para a formação de géis (DAMIAN et al., 2005). Durante o presente trabalho, foi observado que ajustes do pH superiores a 6,2 estão associados a quebra da solução de quitosana, ocasionando a imediata precipitação do polímero, o que também foi observado no trabalho de Gratieri et al. (2010).

No entanto, sabe-se que o olho é mais tolerante às soluções com pH inferior, ácidos, do que às soluções básicas, sendo que apenas as formulações com pH menor do que 5,0 é que estimulam a produção lacrimal e aumentam a drenagem, diminuindo, portanto, a biodisponibilidade do fármaco (GREAVES et al., 1993). Desta forma, acredita-se que apesar de ligeiramente inferior ao fisiológico, o pH não será uma condição limitante à utilização das formulações.

O potencial zeta dos géis termorreversíveis *in situ* contendo insulina e dos géis contendo as micropartículas quitosana/insulina foi, respectivamente, $+33,61 \pm 2,46$ e $+32,94 \pm 2,86$ mV. A carga residual positiva foi conferida pela quitosana, polímero catiônico (GRIBANOV e SAZANOV, 2008), no pH em que os géis foram preparados. De acordo com Hincapie et al. (2010) as formulações podem ser consideradas eletrostaticamente mais estáveis quando apresentam um potencial zeta na faixa de ± 30 mV. Desta forma, as formulações na forma de gel podem ter como vantagem, além do potencial zeta positivo, que possivelmente favorece a interação fármaco/superfície ocular (MAKHLOF et al., 2008; GRATIERI et al., 2011), também uma maior estabilidade quando comparado com as demais

formulações contendo insulina produzidas neste trabalho, que apresentaram potencial zeta de $+11,48 \pm 0,89$ mV e $-4,15 \pm 0,92$ mV, respectivamente para as dispersões contendo as micropartículas com insulina e contendo somente a insulina livre.

5.2. Quantificação da insulina por ELISA

Durante o estudo, todas as análises realizadas por ELISA foram feitas em duplicata, com a utilização tanto da curva analítica padrão disponível no kit, contendo cinco concentrações de insulina (4,4; 11,7; 54; 190; 337 $\mu\text{UI/mL}$), quanto dos dois controles internos ($28,8 \pm 8,2$ $\mu\text{UI/mL}$ e $84,0 \pm 17$ $\mu\text{UI/mL}$), conforme recomendações do fabricante.

De acordo com as especificações do ICH (2005) o método utilizado apresentou linearidade ($R^2 \geq 0,9994$) (Figura 11), exatidão (entre $96,3 \pm 1,34$ e $104,88 \pm 2,35\%$) e precisão ($\text{CV} < 4,16\%$) para as concentrações de 11,7; 54; 190 e 337 $\mu\text{UI/mL}$ de insulina. Não foi possível quantificar, com precisão e exatidão, as concentrações de insulina inferiores a 11,7 $\mu\text{UI/mL}$. Desta forma, no presente trabalho, foram desconsideradas as quantificações de insulina quando valores inferiores a 11,7 $\mu\text{UI/mL}$ não foram alcançados.

Figura 11: Representação gráfica da curva analítica da insulina, na faixa de concentração de 11,7 à 337 $\mu\text{UI/mL}$, conforme preconizado no kit comercial de ELISA para insulina humana recombinante.

Em relação à especificidade, que diz respeito à habilidade do método em identificar inequivocadamente o analito na presença de outros compostos que possivelmente estarão presentes na amostra, a técnica utilizada foi compatível para

todas as amostras de tecidos (globo ocular, glândula lacrimal e sangue periférico) e formulações (micropartículas, gel termorreversível, dispersões). Ou seja, não houve interferência significativa na quantificação da insulina na presença destes outros compostos. Desta forma, o método mostrou ser adequado para a quantificação da insulina presente tanto nas formulações, quanto nos tecidos.

De fato, esse método é comercialmente utilizado para detectar a presença de moléculas de insulina, biologicamente ativa, em tecidos e no soro sanguíneo (SONAJE et al., 2009; SONAJE et al., 2010). No entanto, recentemente tem sido utilizado com sucesso para detectar e quantificar a atividade biológica da insulina em formulações farmacêuticas, incluindo géis e nano/micropartículas (SAJEESH e SHARMA, 2006a; SAJEESH e SHARMA, 2006b; REKHA e SHARMA, 2009; SONIA et al., 2011; BOWEY et al., 2013).

Sonia et al. (2011), por exemplo, quantificou por ELISA a atividade biológica da insulina presente em micropartículas de quitosana e insulina, produzidas por gelificação ionotrópica, destinadas para liberação oral do fármaco. Já Sajeesh e Sharma quantificaram a atividade biológica da insulina proveniente tanto de nanopartículas (SAJEESH e SHARMA, 2006a), quanto de micropartículas (SAJEESH e SHARMA, 2006b), preparadas por gelificação interiônica, contendo quitosana e insulina para administração por via oral. Bowey et al. (2013) em seu estudo, concluiu ainda, que a técnica do *spray drying* é um método seguro e eficaz para a produção de micropartículas com alginato e insulina, com a devida manutenção da atividade biológica do hormônio, o que foi investigado pelo ELISA.

Essa técnica quantifica a insulina biologicamente ativa com um elevado grau de especificidade, pois as ligações antígeno-anticorpo (Ag-Ac) são altamente dependentes da preservação da integridade da molécula, bem como da sua estrutura tridimensional (SAJEESH e SHARMA, 2006a; SAJEESH e SHARMA, 2006b; SONIA e SHARMA, 2010). Assim, mudanças conformacionais que por ventura pudessem ocorrer durante o processo de obtenção das formulações (géis e micropartículas) tornariam a insulina inativa, impossibilitando a formação do conjugado Ag-Ac (BOWEY et al., 2013) e inviabilizando o seu uso.

É importante ressaltar que toda a insulina que foi quantificada pela técnica do ELISA é proveniente da formulação, uma vez que o kit adquirido é específico para quantificação da insulina humana recombinante, a mesma utilizada no preparo das

formulações, que de acordo com o fabricante, não apresenta reação cruzada com a insulina dos animais utilizado no estudo (ratos), “cross reaction < zero”.

5.3. Estudos *in vivo* com as formulações a base de insulina para o tratamento da síndrome do olho seco e lesões na córnea

5.3.1. Indução do *diabetes mellitus*

O diabetes experimental pode ser induzido por fármacos e por manipulação cirúrgica ou genética em várias espécies de animais (SILVA et al., 2011). A estratégia mais frequentemente utilizada é a indução do diabetes pela estreptozotocina (STZ), administrada tanto pela veia caudal, como intraperitoneal (DELFINO et al., 2002). A STZ destrói seletivamente as células β do pâncreas, levando a deficiência na secreção de insulina e a resistência à insulina, o que caracteriza o DM tipo 1.

Após dois dias da indução do DM pela STZ (60 mg/Kg de peso corporal) os animais já apresentavam a doença. A glicemia capilar foi medida com o auxílio das fitas e do aparelho medidor de glicose com amostra de sangue extraída da veia caudal. Os animais que receberam a STZ apresentaram glicemia capilar, em jejum, de $555,61 \pm 60,22$ mg/dL, já os animais saudáveis que não receberam a STZ e sim, somente o tampão citrato, apresentaram glicemia capilar de $117,0 \pm 8,28$ mg/dL (“t de student”, $p < 0,001$), em jejum, dentro dos limites normais (Figura 12).

Figura 12: Glicemia capilar dos animais dois dias após a indução do *diabetes mellitus*.

Estudos demonstram que a indução do DM em ratos é capaz de provocar alterações nas glândulas lacrimais e no globo ocular, o que torna esses animais úteis para estudos translacionais, podendo ser utilizados, por exemplo, em estudos

com potencial clínico e patológico e em correlações e abordagens terapêuticas, pois apresentam redução da secreção lacrimal e alteração do epitélio corneano (ALVES et al., 2005; WAKUTA et al., 2007). Segundo Modulo et al. (2009) essas alterações são melhor observadas após 8-10 semanas do diabetes.

Desta forma, com o intuito de obter o desbalanço normoglicêmico e consequente lesão na córnea e redução da produção de fluido lacrimal, o tratamento com as formulações só foi iniciado após oito semanas da indução do DM.

5.3.2. Tratamento com as formulações contendo insulina

Para o tratamento, todos os animais receberam diariamente, durante 15 dias, em ambos os olhos, 50 μ L, das formulações contendo ou não insulina. Próximo ao último dia de tratamento, respectivamente no 12º e 14º dia (10ª semana após a indução do DM), dois animais apresentaram opacidade do cristalino, correspondente à catarata. Um dos animais pertencia ao grupo dos diabéticos não tratados e outro pertencia ao grupo dos diabéticos tratado com o gel termorreversível *in situ* sem insulina (Figura 13). Nenhum dos animais tratados com as formulações que continha insulina apresentou opacidade do cristalino.

Figura 13: Animais diabéticos não tratados com a insulina que apresentaram opacidade do cristalino. A) comparação do animal diabético não tratado (seta vermelha) em relação ao animal diabético tratado com a dispersão contendo insulina (seta verde); B) animal diabético tratado com gel termorreversível *in situ* sem insulina; C) animal diabético não tratado.

De acordo com Kojima et al. (2007), após cinco semanas da indução do DM pela STZ, os animais diabéticos não tratados já apresentam os primeiros sinais da manifestação da catarata, com um maior espelhamento de luz e algum comprometimento visual, o que é característico do desbalanço normoglicêmico. Já a opacificação do cristalino começa a ser visualizada após oito semanas de diabetes não tratada, atingindo 100% dos casos em nove semanas, de acordo com Zagon et al. (2007). Para Yoshida et al. (2004), são necessárias 12 semanas para que 100% dos animais diabéticos não tratados apresentem a opacificação do cristalino, sendo que o tratamento subcutâneo com 2 UI de insulina por dia é capaz de reduzir essa incidência nos animais diabéticos sob dieta hipocolesterolêmica para 20%. Quando o tratamento com a insulina foi associado à vitamina E, essa incidência caiu ainda mais, chegando a apenas 10% dos casos.

Apesar de promissor, o tratamento com a insulina realizado por Yoshida et al. (2004) foi iniciado um dia após a indução do DM, o que possibilitou verificar a influência da insulina somente na incidência da catarata. Ao contrário do nosso estudo, no qual o tratamento com as formulações contendo a insulina foi iniciado após a instauração da doença, oito semanas após a indução do DM. Como no nosso estudo não foi verificada a opacidade do cristalino em nenhum dos grupos tratados com a insulina, mesmo ao término do tratamento (10ª semana após indução do DM), acreditamos que o tratamento tópico com a insulina, localizado, possa ter retardado a progressão da catarata. Ao contrário, nos grupos não tratados, de um universo de 15 possíveis animais (diabético não tratado; diabético tratado com o gel termorreversível *in situ* sem insulina e diabético tratado com as micropartículas sem insulina), dois desenvolveram a catarata, representando 13,33% dos casos. Porém, estudos mais específicos devem ser realizados com o intuito de comprovar ou não essa hipótese.

5.3.3. Variação de peso corpóreo e glicemia capilar

Durante o período que antecedeu o início do tratamento, ou seja, durante as oito semanas após a indução do DM, foi observado o ganho de peso corporal dos animais sadios (não diabéticos) em relação aos doentes (diabético não tratado, diabético tratado com e sem insulina). Neste período, os animais DM ganharam apenas $28,27 \pm 2,26$ g, enquanto os não DM ganharam $158,0 \pm 20,66$ g, o que

representou um aumento significativo de peso de mais de cinco vezes (5,58 vezes) (Anova 2way, $p < 0.001$) (Tabela 2), dos animais saudáveis em relação aos DM.

Tabela 2: Peso corpóreo, em g, apresentado pelos animais, antes da indução da DM, antes do início do tratamento e ao término do tratamento

Grupos	Antes do DM (1ª semana)	Peso Corpóreo (g)	
		Início do tratamento (8ª semana)	Término do tratamento (10ª semana)
Não diabético	260,83(±7,04)	418,89(±36,27)	435,41(±39,90)
Diabético não tratado	228,61(±16,74)	266,45(±19,94)	245,22(±35,37)
Diabético tratado sem INS	217,22(±23,15)	233,61(±25,30)	217,96(±24,39)
Diabético tratado com INS	206,56(±28,90)	237,12(±22,31)	209,45(±33,64)

No término do tratamento, os animais saudáveis (não diabético) apresentaram peso corpóreo estatisticamente superior aos animais doentes, sendo eles não tratados ou tratados com as formulações contendo ou não insulina (Anova 2way, $p < 0.001$) (Figura 14). Não foi verificada diferença estatística entre o peso corpóreo final apresentado pelos animais diabéticos tratados sem insulina e com insulina (Anova 2way, $p > 0.05$). No entanto, houve diminuição significativa do peso dos animais diabéticos tratados com a insulina em relação ao peso final apresentado pelos diabéticos não tratados (Anova 2way, $p < 0.05$). O que demonstra que o tratamento com o fármaco contribuiu para a queda do peso corpóreo dos animais. Um estudo realizado por Hallschmid et al. (2004) também verificou redução significativa do peso corpóreo de homens diabéticos tratados com a insulina intranasal, na concentração de 160 UI/dia de hormônio.

Figura 14: Variação do peso dos animais utilizados durante o estudo *in vivo*, em três tempos: antes da indução da DM (1ª semana), antes do início do tratamento (8ª semana) e no término do tratamento (10ª semana). Em destaque a variação de peso dos animais diabéticos tratados com e sem insulina. Não DM: não diabético; DM não tratado: diabético não tratado; DM tratado sem INS: diabético tratado com as formulações sem insulina; DM tratado INS: diabético tratado com as formulações contendo insulina. (Anova 2way, $p < 0,001$).

Em relação a glicemia, parece que o tratamento com as formulações nas quais a insulina foi veiculada foi capaz de reduzir a taxa de açúcar no sangue dos animais. A medida final da glicemia foi realizada no término do tratamento, Dia 15, duas horas após a última instilação das formulações, período necessário para a insulina recombinante humana atingir seu pico plasmático quando administrada por via subcutânea (BIOHULIN®, 2012). Os resultados demonstram que ao término do tratamento houve uma redução, significativa, da glicemia dos animais tratados com a insulina, em relação aos animais não tratados, que apresentaram, respectivamente, $379,83 \pm 69,96$ e $574,42 \pm 25,15$ mg/dL (Anova 2way, $p < 0,001$) (Figura 15), o que sugere um efeito sistêmico positivo das formulações contendo insulina.

Figura 15: Variação da glicemia capilar nos animais em três tempos: antes do DM, início do tratamento (Dia 0) e no término do tratamento (Dia 15) (Anova 2way, $p < 0,001$).

Há alguns anos têm sido desenvolvidos diversos estudos propondo rotas alternativas para a administração da insulina, entre elas a via ocular (CHRISTIE et al., 1931; YAMAMOTO et al., 1989; PILLION et al., 1991). O primeiro estudo foi realizado em 1931, por Christie et al., que propunha a absorção sistêmica da insulina através do olho. Em 1989, Yamamoto constatou que a aplicação tópica ocular da insulina só ocorria quando o fármaco estava associado a algum tipo de promotor de absorção. O que foi comprovado por Pillion et al. (1991), já que durante os seus estudos a insulina tópica ocular só conseguiu reduzir, rápida e efetivamente, a glicemia dos animais diabéticos após a incorporação de 1% de saponina. Os estudos de Zagon et al. (2007), também corroboram esses achados, já que a administração tópica ocular de 1, 2 ou 5 UI de uma solução aquosa simples de insulina, sem a presença de promotores de absorção, quatro vezes ao dia, durante sete dias, não foi capaz de reduzir a glicemia dos animais diabéticos.

No nosso caso, acredita-se que a capacidade de promoção de absorção desempenhada pela quitosana (DI COLO et al., 2008), presente tanto no gel termorreversível *in situ*, quanto nas micropartículas, assim como o tempo prolongado de retenção pré-corneal conferido pelo gel de poloxamer, possa ter favorecido a absorção sistêmica da insulina após a instilação das formulações. Alguns estudos indicam que as nano/micropartículas de quitosana e insulina são eficazes para a redução da glicemia (SAJEESH e SHARMA, 2005; SONAJE et al., 2009; SONIA et al., 2011), no entanto, utilizam na maioria das vezes a rota oral (SAJEESH e

SHARMA, 2005; SONIA et al., 2011), não sendo verificada ainda a utilização de micropartículas quitosana/insulina pela via ocular. Ressalta-se que em nosso estudo foi possível verificar a redução da glicemia com apenas um tratamento diário com as formulações contendo insulina.

5.3.4. Produção de fluido lacrimal (teste fenol vermelho)

O teste do fenol vermelho é considerado um teste semi-quantitativo, indolor, sem dano da córnea e da conjuntiva, aplicado na ausência de anestesia tópica, rápido e reprodutível (HIDA et al., 2005). Foi inicialmente descrito por Hamano et al. (1982) com o objetivo de contornar as possíveis desvantagens do teste de *Schirmer*, como a variabilidade dos resultados, a baixa sensibilidade na detecção de olho seco e o desconforto quando realizado sem anestésico tópico. O RPT é constituído por um cordão especial de algodão que é colocado na porção inferior da pálpebra. O cordão contém fenol vermelho (fenolsulfonaftaleína), indicador sensível de pH, que em contato com a lágrima, passa do amarelo para o vermelho-alaranjado, devido a natureza alcalina da lágrima (HIDA et al., 2005).

Durante o estudo, o RPT foi realizado nos dias 0, 5, 10 e 15 do tratamento, em todos os animais, em ambos os olhos, medida antes da administração diária das formulações. A Figura 16 mostra a quantidade de fluido lacrimal produzido, em mm, antes do início do tratamento nos animais DM e não DM (controle positivo). Pode-se verificar, inicialmente, no Dia 0, que a indução do diabetes foi capaz de reduzir significativamente a produção do fluido lacrimal ao comparar os animais não diabéticos com os diabéticos, respectivamente, $10,7 \pm 1,70$ mm e $5,3 \pm 0,69$ mm (“t de student”, $p < 0,05$) (Figura 17). Confirmando esses achados, estudos com modelos animais diabéticos também demonstraram redução quantitativa e qualitativa da secreção lacrimal (SULLIVAN e HANN, 1989; ALVES et al., 2005). De acordo com Rocha et al. (2000) os mecanismos moleculares destas alterações envolvem a menor ativação do receptor de insulina em glândulas lacrimais dos ratos diabéticos comparada aos ratos normoglicêmicos e normoinsulinêmicos.

Figura 16: Fluido lacrimal produzido antes do início do tratamento, Dia 0, pelos animais não diabéticos, saudáveis, em relação aos animais diabéticos, doentes ("t de *student*", $p < 0,05$).

Após o início do tratamento, pode-se verificar que a produção de fluido lacrimal tendeu a aumentar em todos os grupos tratados com a insulina livre ou encapsulada, o que foi observado já a partir do 5º dia (Tabela 3).

Tabela 3: Fluido lacrimal, em mm, recuperado dos olhos dos animais durante o experimento *in vivo*, medidos pelo teste do fenol vermelho, em função do tempo de tratamento

Grupos	Fluido lacrimal (mm)			
	Dia 0	Dia 5	Dia 10	Dia 15
Não DM (controle positivo)	10,7(±1,70)	12,4(±1,35)	12,5(±1,08)	13,5(±0,85)
DM não tratado (controle negativo)	5,3(±1,63)	5,3(±1,33)	5,9(±0,99)	6,5(±1,18)
DISP MP s/INS	6,3(±1,57)	7,2(±1,93)	8,2(±1,87)	8,6(±2,01)
Gel s/INS	4,3(±1,25)	5,3(±1,34)	6,9(±1,52)	6,8(±1,48)
DISP INS	5,9(±1,19)	9,1(±2,64)	13,2(±1,75)	12,7(±1,89)
DISP MP INS	5,5(±1,71)	9,4(±1,95)	10,4(±1,95)	9,8(±1,62)
Gel INS	4,7(±1,25)	9,3(±2,31)	10,3(±2,31)	9,9(±1,79)
Gel MP INS	5,7(±1,16)	10,1(±1,37)	11,1(±1,37)	11,9(±1,67)

Das formulações contendo insulina a que promoveu maior aumento da produção de lágrimas foi a dispersão contendo insulina, seguida dos géis com micropartículas com insulina e insulina livre, aumento de 6,8, 6,2 e 5,2 mm,

respectivamente, em relação ao início do tratamento, tendo os animais como próprios controles (Figura 17). O que representou um aumento final da produção de fluido lacrimal pelo menos duas vezes superior à inicial, respectivamente, 2,152, 2,087 e 2,106 vezes. Assim, o tratamento com estas formulações contendo insulina conseguiu em um período de 15 dias, com tratamento diário, uma vez ao dia, 50 μL por olho, dobrar a quantidade de fluido lacrimal inicialmente produzida.

Figura 17: Fluido lacrimal recuperado dos olhos dos animais tratados em função do tempo. Os controles negativo e positivo (linhas horizontais pretas) correspondem à produção média de fluido lacrimal nos 15 dias de tratamento dos animais DM não tratados e não DM, respectivamente.

Considerando somente a quantidade final de fluido produzida, ou seja, no último dia de tratamento, Dia 15, a menor produção de lágrimas observada foi verificada para os animais tratados com o gel sem insulina, seguidos da dispersão contendo micropartículas sem insulina, os quais apresentaram produção de fluido semelhante ao grupo dos animais não tratados (controle negativo), inclusive sem diferença estatística em relação a estes (Anova 1way, $p > 0,05$) (Figura 17). O que sugere que o tratamento sem a insulina, somente com os veículos, não pode ser considerado um tratamento adequado, nas condições experimentais (um tratamento diário, durante 15 dias) para a síndrome do olho seco.

Em contrapartida, também no último dia de tratamento, Dia 15, os animais tratados com a dispersão contendo insulina e o gel termorreversível *in situ* com micropartículas quitosana/insulina, aumentaram a produção de fluido de tal maneira que não foi observada diferença estatística destes animais em relação aos animais saudáveis (controle positivo) (Anova 1 way, $p>0,05$) (Figura 17). O que leva a crer que o tratamento com estas formulações foi capaz de regularizar a quantidade de lágrimas produzida, particularmente importante para o tratamento da síndrome do olho seco.

Pode-se observar também na Figura 17 que o gel com as micropartículas contendo insulina aumentou a produção lacrimal em 77% já no 5º dia de tratamento (de 5,7 para 10,1 mm) contra 54% da dispersão contendo insulina (de 5,9 para 9,1 mm), sugerindo um período de produção de fluido lacrimal mais rápido quando o gel contendo as micropartículas quitosana/insulina foi utilizado.

5.3.5. Recuperação da insulina na glândula lacrimal

O desenvolvimento de formulações que sejam capazes de disponibilizar a insulina para a glândula lacrimal são potencialmente favoráveis para o tratamento da síndrome do olho seco. Sabe-se que o fluido lacrimal é produzido pelas glândulas lacrimais, através das células acinares, e que neste tecido existem receptores de insulina. Desta forma, disponibilizar este hormônio direto para a glândula lacrimal pode favorecer a sua ação local, e consequentemente a produção do fluido lacrimal. Neste contexto, foi dosada, por ELISA, a quantidade de insulina presente na glândula após o término do tratamento.

Após o sacrifício dos animais, as glândulas lacrimais foram dissecadas e imediatamente pesadas (Figura 18). Foi verificado que as glândulas lacrimais dos animais saudáveis, ou seja, não diabéticos possuíam peso superior ao dos animais diabéticos, respectivamente, $0,123\pm0,020$ e $0,071\pm0,010$ g (“t de student”, $p<0,0001$) (Figura 19). O que comprova que a indução do diabetes além de reduzir quantitativamente a produção de fluido lacrimal, observado pelo teste do fenol vermelho, também reduziu significativamente o tamanho da glândula, resultados também encontrados por Modulo et al. (2009).

Figura 18: Localização da glândula lacrimal em ratos (seta vermelha).

Figura 19: Peso da glândula lacrimal dos animais não diabéticos em relação aos animais diabéticos ("t de student", $p < 0,05$).

Apesar da diferença significativa no peso da glândula lacrimal dos animais saudáveis em relação aos diabéticos, não houve diferença estatística entre o peso da glândula lacrimal dos diabéticos tratados com as formulações tópicas contendo insulina em relação aos diabéticos não tratados e tratados com as formulações sem insulina, respectivamente $0,069 \pm 0,010$ g e $0,070 \pm 0,008$ g (Anova 1 way, $p > 0,05$), o que demonstra que o tratamento tópico com o hormônio não exerceu influência no peso da glândula lacrimal.

Em relação à recuperação do fármaco na glândula lacrimal, não foi possível dosar com exatidão e precisão a quantidade de insulina presente nas glândulas dos animais não diabético, diabético não tratado, diabético tratado com as formulações sem insulina e diabéticos tratados com a dispersão contendo insulina, que ficaram abaixo de $4,0 \mu\text{UI/mL}$, portanto, menor que o limite de quantificação da curva analítica validada ($11,7 \mu\text{UI/mL}$).

No entanto, a quantidade do hormônio recuperado nos animais tratados com as formulações tópicas contendo os sistemas de liberação com insulina ficou dentro da curva analítica. A maior concentração de insulina no tecido foi verificada para o gel termorreversível *in situ* com as micropartículas quitosana/insulina, seguido da dispersão contendo as micropartículas quitosana/insulina e do gel com insulina, respectivamente, $98,474 \pm 23,322$, $21,525 \pm 6,495$ e $17,881 \pm 7,334 \mu\text{UI/mL}$ (Figura 20).

Figura 20: Dosagem da insulina na glândula lacrimal dos animais após o término do tratamento (Anova 1way, $p < 0,05$).

Os resultados encontrados vão ao encontro do esperado. No caso do gel termorreversível *in situ* com insulina (Gel INS) a presença do hormônio na glândula lacrimal pode ser explicada tanto pelo aumento do tempo de retenção do fármaco no olho, quanto pela característica de promotor de absorção desempenhada pela quitosana. Sabe-se que esse gel possui a capacidade de aumentar o tempo de

residência ocular dos fármacos. Gratieri et al. (2010), por exemplo, verificou que o gel foi capaz de aumentar em até duas vezes o tempo de residência ocular do fluconazol se comparado ao colírio comum (solução aquosa simples). A presença da quitosana é um dos fatores que contribuem para essa retenção, o que ocorre devido a possíveis interações eletrostáticas entre ela, que possui carga residual positiva e a mucina, que possui carga residual negativa. Além disso, esse polímero também está associado à promoção da absorção, o que pode ter contribuído para a disponibilização do fármaco à glândula lacrimal. Desta forma, o gel termorreversível *in situ* contendo insulina, ao aumentar o tempo de residência da insulina no olho, favoreceu além do efeito local, observado pelo aumento da produção de fluido lacrimal, a disponibilização do fármaco ao tecido alvo, a glândula lacrimal.

Já em relação à dispersão contendo as micropartículas quitosana/insulina (DISP MP INS), sabe-se que micropartículas de quitosana promovem a liberação sustentada de fármacos, como o observado por Gelfuso et al. (2011) durante a caracterização de micropartículas quitosana/minoxidil. No caso das micropartículas quitosana/insulina, além dessa possível liberação sustentada da insulina, outro fator que pode ter contribuído para a presença da insulina na glândula lacrimal é o tamanho das micropartículas. De acordo com estudos com sistemas microparticulados menores que 10 μm , essas micropartículas ficam retidas no saco lacrimal, o que reduz a perda do fármaco pelos mecanismos de lacrimejação e absorção improdutiva, favorecendo, portanto o seu efeito local (KAUR et al., 2004; BIN CHOY et al., 2008). Desta forma, a permanência das micropartículas no saco lacrimal pode ter proporcionado a liberação da insulina por um período prolongado, o que pode explicar a presença do hormônio, proveniente dessas formulações, na glândula lacrimal, como consequência de um possível efeito acumulativo.

No caso do gel termorreversível *in situ* com as micropartículas com quitosana/insulina (Gel MP INS), no qual há a presença simultânea dos dois sistemas de liberação, ou seja, gel termorreversível *in situ* e micropartículas, foi observada uma quantidade de insulina maior ainda na glândula. Desta forma, o gel provoca um aumento do tempo de retenção das micropartículas na região pré-corneal, as quais liberam controlada e sustentadamente a insulina, além de retê-las no saco lacrimal, ocasionando um efeito acumulativo. Inclusive, de acordo com os resultados, pode-se até mesmo pensar em uma resposta sinérgica, já que a

quantidade de insulina recuperada na glândula proveniente do gel termorreversível *in situ* com as micropartículas quitosana/insulina é 2,5 vezes superior ao somatório da quantidade de insulina disponibilizada pelos dois outros sistemas, individualmente. Neste contexto, o gel termorreversível *in situ* com as micropartículas quitosana/insulina parece ser a formulação mais apropriada para o tratamento da síndrome do olho seco.

5.3.6. Recuperação da insulina no globo ocular

Ao pensar no desenvolvimento de formulações tópicas destinadas ao tratamento de lesões na córnea torna-se interessante a produção de sistemas que possibilitem um maior tempo de contato do fármaco com a superfície ocular. No caso da insulina, a confirmação da presença de seus receptores na superfície ocular, associada aos seus já conhecidos efeitos metabólicos e mitogênicos, reforça a necessidade do desenvolvimento de formulações capazes de disponibilizar, por um maior tempo, este hormônio aos seus receptores, o que poderia favorecer a sua ação local e ser promissor para o tratamento de lesões na córnea. Neste contexto, a insulina extraída do globo ocular também foi dosada após o término do tratamento.

Não foi possível dosar com precisão e exatidão a quantidade do fármaco presente no globo ocular dos animais não diabético, diabético não tratado, diabético tratado com as formulações sem insulina e diabético tratado com a dispersão contendo insulina, que ficaram abaixo do menor ponto ($11,7 \mu\text{UI/mL}$), com precisão e exatidão, da curva padrão do kit de ELISA. No entanto, assim como o observado para a glândula lacrimal, a dosagem de insulina a partir das formulações tópicas contendo sistemas de liberação, foram maiores. Novamente, a maior concentração do hormônio no globo ocular foi verificada para o gel termorreversível *in situ* com as micropartículas com quitosana/insulina, mas seguido do gel com insulina e só depois pela dispersão contendo as micropartículas com quitosana/insulina, respectivamente, $98,966 \pm 34,336$, $30,932 \pm 2,636$ e $26,745 \pm 6,495 \mu\text{UI/mL}$ (Figura 21).

Figura 21: Dosagem da insulina no globo ocular dos animais após o término do tratamento (Anova 1 way, $p < 0,05$).

A recuperação da insulina do globo ocular foi realizada, aproximadamente, 18 horas após a última instilação, ou seja, na manhã posterior ao último dia de tratamento. Devido às características do gel termorreversível *in situ* de prolongar o tempo de retenção dos fármacos na superfície ocular, as formulações nas quais a insulina foi veiculada ao gel, foram as que resultaram na maior recuperação da insulina no globo ocular, mesmo após 18 horas da última instilação. Ou seja, foram as formulações que conseguiram manter a insulina ativa por um período maior de tempo no sítio de ação desejado, a superfície ocular. Já em relação à dispersão contendo as micropartículas com quitosana/insulina, apesar da liberação sustentada da insulina a partir dele, mais facilmente deve ter sido eliminado devido a menor viscosidade da dispersão em relação ao gel, resultando numa menor biodisponibilidade (GHATE et al., 2006; GAUDANA et al., 2009).

Assim como o ocorrido nos estudos de recuperação da insulina da glândula lacrimal, parece que também no globo ocular pode-se observar um efeito sinérgico ao se associar os dois sistemas, gel termorreversível *in situ* e micropartículas quitosana/insulina, em uma mesma formulação. O que é comprovado pela elevada quantidade de insulina recuperada no globo ocular dos animais tratados com esta formulação. Desta forma, parece que também para o efeito local, visando à

cicatrização de lesões na córnea, a formulação contendo o gel termorreversível *in situ* com micropartículas quitosana/insulina é a mais apropriada.

5.3.7. Dosagem da insulina no sangue periférico

Uma das vantagens do tratamento tópico, localizado na superfície do olho, para as lesões na córnea e a síndrome do olho seco é justamente a sua ação local, sem interesse na absorção sistêmica, considerada, neste caso, improdutiva. Desta forma, a insulina foi dosada na circulação sanguínea dos animais, ao término do tratamento.

Com amostras de 1 mL de sangue, a quantidade de insulina dosada no sangue periférico da maioria dos animais foram insignificantes, ficando abaixo do menor ponto da curva padrão do Kit de ELISA (11,7 $\mu\text{UI/mL}$). No entanto, assim como a dosagem da insulina na glândula lacrimal e no globo ocular, a quantidade do fármaco encontrada no sangue periférico dos animais tratados com as formulações contendo insulina nos sistemas de liberação, foi superior. Sendo que, o gel termorreversível *in situ* com micropartículas quitosana/insulina foi o que apresentou maior dosagem, $14,032 \pm 2,260 \mu\text{UI/mL}$ (Figura 22).

Figura 22: Dosagem da insulina na circulação sanguínea dos animais após o término do tratamento (Anova 1way, $p < 0,001$).

Mesmo com a pequena quantificação do fármaco no sangue periférico, o tratamento tópico com as formulações contendo insulina, foi capaz de reduzir a glicemia capilar dos animais, após duas horas da última instilação, conforme descrito no item 5.3.3., ou seja, reduziram os níveis de açúcar no sangue, o que pode ser considerado um efeito sistêmico das formulações. Apesar de se tratar de uma absorção improdutiva e não desejada, a queda da glicemia capilar pode ser benéfica nos casos dos pacientes diabéticos, podendo inclusive ser utilizado como uma terapia complementar, coadjuvante ao tratamento com insulinas ou fármacos orais secretagogos, em pacientes diabéticos que apresentem a síndrome do olho seco ou lesões na córnea.

5.3.8. Análise citológica da superfície ocular

A citologia de impressão é um método não invasivo utilizado para a avaliação da superfície ocular, incluindo o epitélio da conjuntiva e da córnea (MARTINEZ et al., 1995). De acordo com Dart (1997) o papel de filtro consegue remover amostras contendo de uma a três camadas de células epiteliais, preservando suas características morfológicas e relações anatômicas. Essa técnica é atualmente utilizada, entre outras finalidades, para o diagnóstico e direcionamento do tratamento da síndrome do olho seco (GOMES, 2000).

No presente estudo a análise microscópica das células obtidas através da citologia de impressão foi feita de acordo com a escala de Nelson (NELSON, 1988), na qual foram levadas em consideração o volume da população celular, a relação núcleo citoplasma, a presença ou ausência de núcleo e a morfologia das células. De acordo com as análises, somente as lâminas provenientes dos animais saudáveis (controle positivo) foram classificadas como de Grau 0, cuja característica é a grande população de células em diversos campos, morfolologicamente pequenas e arredondadas, núcleo grande e basofílico (coram-se intensamente de roxo pela hematoxilina), com uma relação núcleo:citoplasma de 1:2. Já as lâminas dos animais diabéticos que não receberam nenhum tipo de tratamento foram classificadas como Grau 3, cuja característica é a pequena quantidade de células por campo, com morfologia disforme, ausência de núcleo com elevada frequência e relação núcleo citoplasma 1:6 (Figura 23).

Figura 23: Análise por citologia de impressão da superfície ocular dos animais ao término do tratamento, Dia 15. Aumento x 40.

De fato, diversos estudos corroboram os nossos achados. De acordo com Nelson et al. (1983) os pacientes diabéticos apresentam maior número de células com metaplasia escamosa, ou seja, células disformes poligonais, com núcleo picnótico ou ausente, grande relação núcleo citoplasma (1:5 e 1:6) e ausência de muco, características observadas no Grau 3. Dogru et al. (2001) e Yoon et al. (2004), também observaram mudanças morfológicas das células epiteliais da córnea dos diabéticos através da citologia de impressão, as quais são marcadas por uma menor densidade celular com grande número de células disformes, podendo ou não conter núcleo.

Em relação aos animais tratados com e sem insulina, os resultados foram semelhantes. Foram classificadas como de Grau 1, os animais que foram tratados tanto com a dispersão contendo micropartícula quitosana/insulina, quanto com o gel termorreversível *in situ* contendo a insulina livre e a encapsulada. E Grau 2, aqueles que foram tratados com a dispersão contendo insulina e as formulações sem insulina (Figura 23).

Para a análise dos resultados foi utilizada a ferramenta estatística de confiabilidade, conhecida como kappa de Cohen (COHEN, 1960). Que nada mais é do que uma medida de concordância intra e inter-observador que mede o grau de acordo entre os avaliadores além do que seria esperado tão somente pelo acaso. O kappa varia de -1 a +1, sendo respectivamente, menor e maior concordância (COHEN, 1960). Para a interpretação usou-se a classificação sugerida por Nigel Paneth, que julga uma concordância excelente acima de 0,80, bom entre 0,60 e 0,80, regular entre 0,40 e 0,60, e ruim $< 0,40$ (NIGEL et al., 2007).

No nosso trabalho o índice de concordância obtido entre os dois pesquisadores (kappa) foi de 0,72, o que pode ser considerado “bom”, de acordo com a classificação de Nigel Paneth (NIGEL et al., 2007). Sendo que, mesmo quando os pesquisadores foram divergentes não houve variação de mais de um ponto, nem pra mais e nem pra menos, em relação ao resultado.

Essas análises nos permite inferir que o tratamento com as formulações contendo insulina, exceto a dispersão com insulina livre, foi capaz de melhorar qualitativamente as células do epitélio da córnea, já que foram as que mais se aproximaram do animal saudável, que obteve Grau 0. O que vai ao encontro das análises da produção de fluido lacrimal realizada pelo teste do fenol vermelho. Sendo, portanto, as formulações mais indicadas para o tratamento tanto da síndrome do olho seco, quanto de lesões na córnea.

5.3.9. Espessura da córnea

A espessura da córnea é um dado biométrico importante na avaliação clínica de pacientes que apresentam diversos tipos de alterações oculares, entre eles hipertensão ocular, glaucoma, ceratocone (HASHEMI e MEHRAVARAN, 2007), síndrome do olho seco, *diabetes mellitus* (MODIS et al., 2001) e lesões na córnea

(ZAGON et al., 2006; ZAGON et al., 2007). Essa medida reflete a saúde tecidual, em função do funcionamento correto da bomba endotelial (LUZ et al., 2006).

Após a histologia, foi realizada a análise microscópica e então mensurada a espessura do epitélio da córnea em todas as lâminas (Figura 24), sendo que de cada lâmina foram extraídas três medidas (Tabela 4). Foi verificada diferença estatística entre o valor encontrado para a espessura do epitélio dos animais saudáveis, controle positivo, em relação aos animais diabéticos não tratados, controle negativo, respectivamente, $16,24 \pm 2,74$ e $11,81 \pm 3,07$ μm (Anova 1 way, $p < 0.05$). Alguns estudos recentes também demonstram uma redução da espessura do epitélio da córnea em pacientes portadores da síndrome do olho seco, em relação aos indivíduos saudáveis (CUI et al., 2014).

Figura 24: Fotomicrografia contendo a mensuração da espessura do epitélio da córnea, em μm . Lâmina corada com Hematoxilina-eosina, aumento de 40 x, animal não diabético, controle positivo. Aumento de x 40.

Já para os animais tratados foi observada diferença estatística apenas naqueles que receberam o tratamento com o gel termorreversível *in situ* com insulina e com micropartícula quitosana/insulina, respectivamente, $17,38 \pm 4,31$ e $16,49 \pm 2,47$ μm , em relação controle negativo, $11,81 \pm 3,07$ μm (Anova 1 way, $p < 0.05$) (Tabela 4). Além de serem estatisticamente diferentes dos animais diabéticos não tratados, não houve diferença significativa desses animais em relação aos saudáveis, sem diabetes (Anova 1 way, $p > 0.05$). O que nos permite concluir,

associado ao resultado obtido na citologia de impressão, que o tratamento com essas duas formulações foi a que possibilitou a melhor reestruturação do epitélio corneano.

Tabela 4: Espessura do epitélio da córnea, expressos em média e desvio padrão, em μm , de todos os animais utilizados no experimento *in vivo*, após o sacrifício

Grupo	Espessura (μm)
Não DM	16,24($\pm 2,74$)
DM não tratado	11,81($\pm 3,07$)
DM Dispersão INS	15,48($\pm 3,09$)
DM Dispersão MP s/INS	14,69($\pm 1,81$)
DM Dispersão MP INS	14,91($\pm 2,89$)
DM Gel s/INS	13,92($\pm 1,29$)
DM Gel INS	17,38($\pm 4,32$)
DM Gel MP INS	16,49($\pm 2,48$)

Em relação aos demais animais tratados, tanto com as formulações com ou sem insulina, não foi verificada diferença estatística da espessura do epitélio da córnea desses animais, nem em relação aos animais saudáveis e nem em relação aos animais doentes sem tratamento (Anova 1 way, $p > 0.05$) (Figura 25). Resultado semelhante ao observado por Zagon et al. (2006) e (2007), que nos seus estudos, apesar de verificar uma ligeira redução da espessura da córnea dos animais doentes em relação aos saudáveis, nem o tratamento subcutâneo (ZAGON et al., 2006), nem o tratamento com a solução contendo insulina aplicada topicamente no olho (ZAGON et al., 2007), foi capaz de alterar significativamente o tamanho do epitélio corneano. No entanto, foi verificado pelos mesmos autores, em ambos os casos, uma redução significativa da pressão intra-ocular dos animais diabéticos não tratados em relação aos diabéticos que receberam tratamento com a insulina. De acordo com Luz et al. (2006), a espessura do epitélio da córnea está diretamente relacionada a pressão intra-ocular, sendo que quanto mais fina é a córnea, menor será a sua resistência e menor será a sua pressão intra-ocular. Sendo, portanto, um

indício da alteração do epitélio da córnea em animais diabéticos tratados ou não tratados.

Figura 25: Espessura do epitélio da córnea, em μm .

6. CONCLUSÕES

- As micropartículas de quitosana/insulina, obtidas por *spray drying*, apresentaram elevada quantidade de insulina ativa no pó aspergido, além de tamanho, morfologia e potencial zeta adequados para a administração tópica ocular;
- O gel termorreversível *in situ* de quitosana 1% e poloxamer 407 16% contendo insulina apresentou osmolalidade e pH compatíveis para a veiculação ocular, além de potencial zeta positivo;
- Foi possível incorporar as micropartículas de quitosana/insulina ao gel termorreversível *in situ*, constituindo, assim uma formulação com dois sistemas de liberação;
- A indução do *diabetes mellitus* por estreptozotocina foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de fluido lacrimal produzida pelos animais doentes, em relação aos animais saudáveis;
- O estudo *in vivo* com as formulações contendo insulina indicou aumento da quantidade de fluido lacrimal, sendo que os animais tratados com a dispersão contendo insulina e com o gel termorreversível *in situ* contendo as micropartículas

quitosana/insulina apresentaram a mesma quantidade de fluido lacrimal que os animais saudáveis;

- Foi possível detectar a presença da insulina proveniente das formulações nas glândulas lacrimais e no globo ocular dos animais tratados topicamente, sendo que o sistema contendo o gel termorreversível *in situ* contendo as micropartículas quitosana/insulina foi o que apresentou melhor desempenho;

- O tratamento tópico com as formulações contendo insulina foi capaz de reduzir a glicemia capilar dos animais após duas horas do tratamento, o que pode ser importante como uma terapia complementar em pacientes diabéticos já em uso de insulinas ou fármacos orais secretagogos;

- As análises da citologia de impressão da córnea mostraram que as células do epitélio dos animais tratados com a dispersão contendo as micropartículas quitosana/insulina e com o gel termorreversível *in situ* contendo a insulina livre e contendo a insulina encapsulada apresentaram-se em número e relação núcleo/citoplasma semelhantes as células dos animais saudáveis;

- As análises histológicas mostraram que a espessura do epitélio da córnea dos animais tratados com o gel termorreversível *in situ* com insulina e com micropartícula quitosana/insulina foi a que mais se assemelhou a dos animais saudáveis, sem diferença estatística;

- Associando os resultados de produção de fluido lacrimal, citologia de impressão e espessura do epitélio da córnea, além da recuperação da insulina na glândula lacrimal e no globo ocular, a formulação mais indicada para o tratamento da síndrome do olho seco e lesões na córnea é o gel termorreversível *in situ* contendo as micropartículas quitosana/insulina.

7. REFERÊNCIAS

ABDELKADER, H.; PATEL, D. V.; MCGHEE, C. N. J.; ALANY, R. G. New therapeutic approaches in the treatment of diabetic keratopathy: a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 39, n.3, p. 259-270, 2011.

ABELHA, T.F.; VICENTINI, F.T.M.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Osmolality determination of poloxamer 407 thermosetting gels for ocular delivery. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n.1, p., 2012.

AGRAWAL, V.B.; TSAI, R.J. Corneal epithelial wound healing. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 51, n. 1, p. 5-15, 2003.

AHMAD, M.; MANDI, A.; USMAN, M.; MUNIR, A.; AKHTAR, N.; KHAN, H.M.S. Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 75, p. 384-7, 2011.

ALVES, M.; CALEGARI, V. C.; CUNHA, D. A.; SAAD, M. J. A.; VELLOSO, L. A.; ROCHA, E. M. Increased expression of advanced glycation end-products and their receptor, and activation of nuclear factor kappa- β in lacrimal glands of diabetic rats. **Diabetologia**, v. 48, n. 12, p. 2675-81, 2005.

ALVES, M.C.; CARVALHEIRA, J. B.; MODULO, C. M.; ROCHA, E. M. Tear film and ocular surface changes in *diabetes mellitus*. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 71, n. 6, p. 96-103, 2008.

ANUMOLU, S.S.; SINGH, Y.; GAO, D.; STEIN, S.; SINKO, P.J. Design and evaluation of novel fast forming pilocarpine-loaded ocular hydrogels for sustained pharmacological response. **Journal of Control Release**, v. 137, n. 2, p. 152-9, 2009.

AYALASOMAYAJULA, S.P.; KOMPELLA, U.B. Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles retinal drug levels and alleviate diabetes- induced oxidative stress in a rat model. **European Journal of Pharmacology**, v. 511, n. 2-3, p. 191- 198, 2005.

AZAR, D.T.; SPURR-MICHAUD, S.J.; TISDALE, A.S.; GIPSON, I.K. Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas. **Archives of Ophthalmology**, v. 110, n. 4, p. 537-40, 1992.

BAEYENS, V.; GURNY, R. Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 72, n. 4, p. 191-202, 1997.

BANDEEN-ROCHE, K.; MUNOZ, B.; TIELSCH, J.M.; WEST, S.K.; SCHEIN, O.D. Self-reported assessment of dry eye in a population-based setting. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 12, p. 2469-75, 1997.

BARTLETT, J.D.; TURNER-HENSEN, A.; ATCHISON, J.A.; WOOLLEY, T.W.; PILLION, D.J. Insulin administration to the eyes of normoglycemic human volunteers. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 683-90, 1994a.

BARTLETT, J.D.; TURNER-HENSEN, A.; ATCHISON, J.A.; WOOLLEY, T.W.; PILLION, D.J. Toxicity of insulin administration chronically to human eye *in vivo*. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 101-7, 1994b.

BASTION, M.L.; LING, K.P. Topical insulin for healing of diabetic epithelial defects?: A retrospective review of corneal debridement during vitreoretinal surgery in Malaysian patients. **The Medical Journal of Malaysian**, v. 68, n. 3, p. 208-16, 2013.

BEAUREGARD, C.; BRANDT, P. C. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists inhibit interleukin-1 beta-mediated nitric oxide production in cultured lacrimal gland acinar cells. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v.19, n. 6, p. 579-87, 2003.

BERDAL, M.; APPELBOM, H. I.; EIKREM, J. H.; LUND, A.; BUSUND, L-T.; HANES, R.; SELJELID, R.; JENSSEN, T. Aminated β -1,3-D-glucan has a dose-dependent effect on wound healing in diabetic db/db mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 5, p. 579-87, 2011.

BILGIHAN, K.; OZDEK, S.; OZOGUL, C.; GURELIK, G.; BILGIHAN, A.; HASANREISOGLU, B. Topical vitamin E and hydrocortisone acetate treatment after photorefractive keratectomy. **Eye**, v. 14, p. 231-7, 2000.

BIN CHOY, Y.; PARK, J.H.; PRAUSNITZ, M.R. Mucoadhesive microparticles engineered for ophthalmic drug delivery. **The Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 69, n. 5-6, p. 1533-6, 2008.

BIOHULIN® - Insulina Humana Regular. Responsável técnico Marco Aurélio de L. Xavier. Montes Claros: Biobrás S.A, 2012. Bula de remédio.

BOWEY, K.; SWIFT, B. E.; FLYNN, L. E.; NEUFELD, R. J. Characterization of biologically active insulin-loaded alginate microparticles prepared by *spray drying*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 3, p. 457-65, 2013.

BOWMAN, L.M.; SI, E.; PANG, J.; ARCHIBALD, R.; FRIEDLAENDER, M. Development of a topical polymeric mucoadhesive ocular delivery system for

azithromycin. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 2, p. 133-139, 2009.

BRYANT, B.J.; KNIGHTS, K.; SALERNO, E. **Pharmacology for health professionals**. 2nd ed. Marrickville, N.S.W.: Elsevier, 2007, p. 1040.

BRANGE, J. **Galenics of insulin: the physic-chemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations**. 1 ed. Springer-Verlag, Berlím, Heidelberg. 103 p. 1987.

BREWITT, H.; SISTANI, F. Dry eye disease. The scale of the problem. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, Suppl. 2, p. 199-202, 2001.

BROWN, K.E.; CONGDON, N.G. Corneal structure and biomechanics: impact on the diagnosis and management of glaucoma. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 17, n. 4, p. 338-343, 2006.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-20, 2001.

CARVALHEIRA, J.B.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.46, n.4, p.419-425, 2002.

CEVHER, R.; ORHAN, Z.; MÜLAZIMOGLU, L.; SENSOY, D.; ALPER, M.; YILDIZ, A.; OZSOY, Y. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, n. 2, p. 127-35, 2006.

CHAUNDHURY, A.; DAS, S. Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents. **AAPS PharmaSciTech**, v. 12, n. 1, p. 10-20, 2010.

CHEATHAM, B.; KAHN, R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 2, p. 117-41, 1995.

CHIEN, H.; TORCHILIN, V.; LANGER, R. Polymerized liposomes as potential oral vaccine carrier: stability and bioavailability. **Journal of Control Release**, v. 42, n. 3, p. 263-72, 1996.

CHRISTIE, C.D.; HANZAL, R.F. Insulin absorption by the conjunctival membranes in rabbit. **Journal of Clinical Investigation**, v. 10, n. 4, p. 787-93, 1931.

CREECH, J.L.; DO, L.T.; FATT, I.; RADKE, C.J. *In vivo* tear-film thickness determination and implications for tear-film stability. **Current Eye Research**, v. 17, n. 11, p. 1058-66, 1998.

CROSSON, C.E.; KLYCE, S.D.; BEUERMAN, R.W. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 27, n. 4, p. 464-73, 1986.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, n. 1, p. 37-46, 1960.

COZAR-BERNAL, M. J.; HOLGADO, M. A.; ARIAS, J. L.; MUNOZ-RUBIO, I.; MARTIN-BANDERAS, L.; ALVAREZ-FUENTES, J.; FERNANDEZ-AREVALO, M. Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing *versus* Double emulsion/solvent evaporation. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n.5, p. 430-41, 2011.

CUI, X.; HONG, J.; WANG, F.; YANG, Y.; XU, J.J. Assessment of corneal epithelial thickness in dry eye patients evaluated by Fourier-domain optical coherence tomography. In: **ARVO 2014 – Annual Meeting Abstracts, 506 – Corneal Epithelium and Development**, 2014. Disponível em: <<http://www.arvo.org/webs/am2014/abstract/sessions/506.pdf>>. Acesso em: 19 de junho de 2014.

CUNHA, D.A.; CARNEIRO, E.M.; ALVES, M.C.; JORGE, A.G.; SOUSA, S.M.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J. A.; VELLOSO, L.A.; ROCHA, E.M. Insulin secretion by rat lachrymal glands: effects of systemic and local variables. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 5, p. 768-75, 2005.

CUNHA, D.A.; ALVES, M.C.; STOPPIGLIA, L.F.; JORGE, A.G.; MODULO, C.M.; CARNEIRO, E.M.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J.A.; VELLOSO, L.A.; ROCHA, E.M. Extra-pancreatic insulin production in rat lachrymal gland after streptozotocin-induced islet β -cells destruction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1770, n.8, p. 1128-35, 2007.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPIRITO-SANTO, M.L.P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DANIELS, J.T.; DART, J.K.; TUFT, S.J.; KHAW, P.T. Corneal stem cells in review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 6, p. 483-94, 2001.

DART, J. Impression cytology of the ocular surface – research tool or routine clinical investigation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 81, n. 11, p. 930, 1997.

DATE, A.A.; JOSHI, M.D.; PATRAVALE, V.B. Parasitic diseases: lipossomes and polymeric nanoparticles *versus* lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 505-21, 2007.

DAVIDSON, H.J.; KUONEN, V.J. The tear film and ocular mucins (Review). **Veterinary Ophthalmology**, v.7, n. 2, p. 71-7, 2004.

DAVIS, S.N.; GRANNER, D.K. **Insulina, Hipoglicemiantes Orais e a Farmacologia do Pâncreas Endócrino**. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cap. 61, p. 1263-1290, 2005.

DEGENHARDT, T.P.; ALDERSON, N.L.; ARRINGTON, D.D.; BEATTIE, R.J.; BASGEN, J.M.; STEFFES, M.W.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. **Kidney International**, v. 61, n.3, p. 939-50, 2002.

DEL AMO, E.M.; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3-4, p. 135-43, 2008.

DELFINO, V.D.A.; FIGUEIREDO, J.F.; MATSUO, T.; FAVERO, M.E.; MATNI, A.M.; MOCELIN, A.J. *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31-6, 2002.

DEPRETER, F.; AMIGHI, K. Formulation and *in vitro* evaluation of highly dispersive insulin dry powder formulations for lung administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 3, p. 454-63, 2010.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by *spray drying*: effect of cross-linking agent on the properties of *spray dried* microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 4, p. 377-95, 2005.

DI COLO, G.; ZAMBITO, Y.; ZAINO, C. Polymeric enhancers of mucosal epithelia permeability: synthesis, transepithelial penetration-enhancing properties, mechanism of action, safety issues. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 97, n. 5, p. 1652-80, 2008.

DODANE, V.; KHAN, M.A.; MERWIN, J.R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 182, n. 1, p. 21-32, 1999.

DOGRU, M.; KATAKAMI, C.; INOUE, M. Tear function and ocular surface changes in noninsulin-dependent diabetes mellitus. **Ophthalmology**, v. 108, n. 3, p. 586-92, 2001.

Dry Eye Workshop (DEWS) Committee. Report of the Dry Eye Workshop (DEWS). **The Ocular Surface**, v. 5, n. 2, p.65-204, 2007.

DUA, H.S.; GOMES, J.A.; SINGH, A. Corneal epithelial wound healing. **British Journal of Ophthalmology**, v. 78, n. 5, p. 401-8, 1994.

EBARA, T.; CONDE, K.; KAKO, Y.; LIU, Y.; XU, Y.; RAMAKRISHNAN, R.; GOLDBERG, I.J.; SHACHTER, N.S. Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice. **The Journal Clinical Investigation**, v. 105, n. 12, p. 1807-18, 2000.

EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETTERSON, R. Rheological evaluation of poloxamer as an *in situ* gel for ophthalmic use. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 105-112, 1998.

EL KAMEL, A.; SOKAR, M.; NAGGAR, V.; AL GAMAL, S. Chitosan and sodium alginate-based bioadhesive vaginal tablets. **AAPS PharmSci**, v. 4, n. 4, p. E44, 2002.

ELSAYED, A.; AL-REMAWI, M.; FAROUK, A.; BADWAN, A. Insulin-chitosan polyelectrolyte nanocomplexes: preparation, characterization and stabilization of insulin. **Sudan Journal of Medical Science**, v. 5, p. 99-110, 2010.

ETHIER, C.R.; JOHNSON, M.; RUBERTI, J. Ocular biomechanics and biotransport. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 6, p. 249-73, 2004.

EVANS, M.D.; McFARLAND, G.A.; TAYLOR, S.; WALBOOMERS, X.F. The response of healing corneal epithelium to grooved polymer surfaces. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 1703-11, 2005.

FARRIS, R.L.; STUCHELL, R.N.; MANDEL, I.D. Tear osmolarity variation in the dry eye. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 84, p. 250-68, 1986.

FILENIUS, S.; TERVO, T.; VIRTANEN, I. Production of fibronectin and tenascin isoforms and their role in the adhesion of human immortalized corneal epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 8, p. 3317-25, 2003.

FINI, M.E. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 18, n. 4, p. 529-51, 1999.

FONSECA, E.C.; ARRUDA, G.V.; ROCHA, E.M. Dry eye: etiopathogenesis and treatment. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, v. 73, n. 2, p. 197-203, 2010.

FOSTER, A.; RESNIKOFF, S. The impact of vision 2020 on global blindness. **Eye**, v. 19, n. 10, p. 1133-5, 2005.

FRANZEN, A.A.; PIGATTO, J.A.; ABIB, F.C.; ALBUQUERQUE, L.; LAUS, J.L. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 4, p. 222-6, 2010.

GAYTON, J.L. Etiology, prevalence and treatment of dry eye disease. **Clinical Ophthalmology**, v. 3, p. 405-12, 2009.

GELFUSO, G.M.; GRATIERI, T.; SIMAO, P.S.; FREITAS, L.A.P.; LOPEZ, R.F.V. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p.650-658, 2011.

GENC, L.; DEMIREL, M.; YAZAN, Y. Preparation of prolonged release clarithromycin microparticles for oral use and their *in vitro* evaluation. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, n.10, p. 921-7, 2006.

GEORGIEV, D. Photons do collapse in the retina not in the brain cortex: evidence from visual illusions. **NeuroQuantology**, v. 9, n. 2, p. 206-30, 2011.

GILBARD, D.J.P.; ROSSI, S.R.; GRAY, K.L. A new rabbit model keratoconjunctivitis sicca. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 28, n. 2, p. 225-8, 1987.

GINSBURG, H.N. Insulin resistance and cardiovascular disease. **Journal Clinical Investigation**, v. 106, n. 4, p. 453-8, 2000.

GIPSON, I.K.; WESTCOTT, M.J.; BROOKSBY, N.G. Effects of cytochalasins B and D and colchicine on the migration of corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 22, n. 5, p. 633-642, 1982.

GHATE, D.; EDELHAUSER, H.F. Ocular drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 3, n. 2, p. 275-87, 2006.

GOEBBELS, M. Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics. **British Journal of Ophthalmology**, v. 84, n. 1, p. 19-21, 2000.

GOMES, J.A.P. Update of the treatment of cicatricial keratoconjunctivitis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, n. 1, p. 91-96, 2000.

GRASS, G.M.; ROBINSON, J.R. Mechanisms of corneal drug penetration. II: Ultrastructural analysis of potential pathways for drug movement. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 77, n. 1, p. 15-23, 1988.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; FREITAS, O.; ROCHA, E.M.; LOPEZ, R.F.V. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan *in situ* forming gel. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 320-327, 2011.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; ROCHA, E. M.; SARMENTO, V. H.; FREITAS, O.; LOPEZ, R. F. V. A poloxamer/chitosan *in situ* forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 186-93, 2010.

GREAVES, J.L.; WILSON, C.G. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, n. 3, p. 349-83, 1993.

GRIBANOV, A.V.; SAZANOV, Y.N. Polyacrylonitrile: carbonization problems. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 81, n. 6, p. 919-32, 2008.

GUADANA, R.; JWALA, J.; BODDU, S.H.; MITRA, A.K. Recent perspectives in ocular drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1197-1216, 2009.

HALLSCHMID, M.; BENEDICT, C.; SCHULTES, B.; FEHM, H-L.; BORN, J.; KERN, W. Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. **Diabetes**, v. 53, n. 11, p. 3024-9, 2004.

HAMANO, H.; HORI, M.; MITSUNAGA, S.; KOJIMA, S.; MAESHIMA, J. Tear test (preliminary report). **Journal of the British Contact Lens Association**, v. 24, p. 103-7, 1982.

HAMPEL, U.; KLONISCH, T.; SEL, S.; SCHULZE, U.; GARREIS, F.; SEITMANN, H.; ZOUBOULIS, C.C.; PAULSEN, F.P. Insulin like factor 3 promotes wound healing at the ocular surface. **Endocrinology**, v. 154, n. 6, p. 2034-45, 2013.

HANNA, C.; O'BRIEN, J.E.; Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. **Achieves of Ophthalmology**, v. 64, p. 536-9, 1960.

HAO, J.; LI, S.K.; KAO, W.Y.; LIU, C.Y. Gene delivery to cornea. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 2-3, p. 256-61, 2010.

HARTLEY, C.; WILLIAMS, D.L.; ADAMS, V.J. Effect of age, gender, weight and time of day on tear production In normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 1, p. 53-57, 2006.

HASHEMI, H.; MEHRAVARAN, S. Central corneal thickness measurement with Pentacan, Orbscan, and ultrasound devices before and after laser refractive surgery for myopia. **Journal of Cataract Refract Surgery**, v. 33, n. 10, p. 1701-7, 2007.

HEIGLE, T.J.; PFLUGFELDER, S.C. Aqueous tear production in patients with neurotrophic keratitis. **Cornea**, v.15, n. 2, p. 135-8, 1996.

HIDA, R.Y.; NISHIWAKI-DANTAS, M.C.; HIDA, M.M.; TSUBOTA, K. Quantitative tear study using the red phenol test in the Brazilian population. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 68, n. 4, p. 433-37, 2005.

HINCAPIEA, D.; KREUZERB, H.J.; GARCIA-SUCERQUIA, J. Zeta potential measurement with digital in-line holographic microscopy. **Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas**, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2010.

HOEMANN, C.D.; CHENITE, A.; SUN, J.; HURTIG, M.; SERREGI, A.; LU, Z.; ROSSOMACHA, E.; BUSCHMANN, M.D. Cytocompatible gel formation of chitosan-glycerol phosphate solutions supplemented with hydroxyl ethyl cellulose is due to the presence of glyoxal. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 83, n. 2, p. 521-9, 2007.

HOFFMAN, A.; OWNBY, C.; LEHENBAUER, T.W.; SAMUELSON, D.; GILMOUR, M.; BARTELS, K. Light and electron microscopic evaluation of canine corneal endothelium following CO₂ photokeratotomy. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, Supl: 1, p. 28-34, 2009.

HOLLANDER, D.A.; ALDAVE, A.J. Drug-induced corneal complication. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 15, n. 6, p. 541-548, 2004.

HOLLY, F.J.; ESQUIVEL, E.D. Colloid osmotic pressure of artificial tears. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 327-36, 1985.

HSU, J. Drug delivery methods for posterior segment disease. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 18, n. 3, p. 235-9, 2007.

HUANG, F.C.; TSENG, S.H.; SHIH, M.H.; CHEN, F.K. Effect of artificial tears on corneal surface regularity, contrast sensitivity, and glare disability in dry eyes. **Ophthalmology**, v. 109, n. 10, p. 1934-40, 2002.

HUANG, Y.C.; CHIANG, C.H.; YEH, M.K. Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by *spray drying* method. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 2, p. 235-9, 2007.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. v. 2005.

ISHIDA, N.; RAO, G.N.; DEL CERRO, M.; AQUAVELLA, J.V. Corneal nerve alterations in *diabetes mellitus*. **Archives of Ophthalmology**, v. 102, n. 9, p. 1380-4, 1984.

JARVINEN, K.; JARVINEN, T.; URTTI, A. Ocular absorption following topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3-19, 1995.

JI, J.J.; DING, Z.J.; YANG, X.L. Preparation and properties of chitosan film as a drug sustained-release system. **West China Journal of Stomatology**, v. 27, n. 3, p. 248-51, 2009.

JORGE, A.G.; MODULO, C.M.; DIAS, A.C.; BRAZ, A.M.; FILHO, R.B.; JORDÃO-JUNIOR, A.A.; PAULA, J.S.; ROCHA, E.M. Aspirin prevents diabetic oxidative changes in rat lacrimal gland structure and function. **Endocrine**, v. 35, n. 2, p. 189-97, 2009.

JUHASZ, J.; LENAERTS, V.; RAYMOND, P.; ONG, H. Diffusion of rat atrial natriuretic factor in thermoreversible poloxamer gels. **Biomaterials**, v. 10, n. 4, p. 265-8, 1989.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 488.

KAISERMAN, I.; KAISERMAN, N.; NAKAR, S.; VINKER, S. Dry eye in diabetic patients. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 3, p. 498-503, 2005.

KAJI, Y.; AMANO, S.; USUI, T.; OSHIKA, T.; YAMASHIRO, K.; ISHIDA, S.; SUZUKI, K.; TANAKA, S.; ADAMIS, A.P.; NAGAI, R.; HORLUCI, S. Expression and function of receptors for advanced glycation end products in bovine corneal endothelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 2, p. 521-8, 2003.

KAJI, Y.; USUI, T.; OSHIKA, T.; MATSUBARA, M.; YAMASHITA, H.; ARAIE, M.; MURATA, T.; ISHIBASHI, T.; NAGAI, R.; HORLUCI, S.; AMANO, S. Advanced glycation end products in diabetic corneas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 2, p. 362-8, 2000.

KAO, H.J.; LIN, H.R.; LO, Y.L.; YU, S.P. Characterization of pilocarpine-loaded chitosan/carbopol nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 179-86, 2006.

KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M.; KAHN, C.R. Structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.257, n.17, p.10392-10399, 1982.

KAUR, I.P.; GARG, A.; SINGLA, A.K.; AGGARWAL, D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p. 1-14, 2004.

KAUR, I.P.; KANWAR, M. Ocular preparations: the formulation approach. **Drug Development Industrial Pharmacy**, v. 48, n. 5, p. 473-93, 2002.

KERN, T.J. Diseases of the cornea and sclera. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual of Small Animal Practice**. 2 ed. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders, 1994. P.1197-1207.

KHANVILKAR, K.; DONOVAN, M.; FLANAGAN, D. Drug transfer through mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 173-193, 2001.

KIM, E.Y.; GAO, Z.G.; PARK, J.S.; LI, H.; HAN, K. rhEGF/HP-beta-CD complex in poloxamer gel for ophthalmic delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 159-67, 2002.

KINOSHITA, S.; ADACHI, W.; SOTOZONO, C.; NISHIDA, K.; YOKOI, N.; QUANTOCK, A.J.; OKUBO, K. Characteristics of the human ocular surface epithelium. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 20, n. 5, p. 639-73, 2001.

KLAUSNER, E.A.; PEER, D.; CHAPMAN, R.L.; MULTACK, R.F.; ANDURKAR, S.V. Corneal gene therapy. **Journal of Control Release**, v. 124, n. 3, p. 107-33, 2007.

KLENKLER, B.; SHEARDOWN, H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. **Experimental Eye Research**, v. 79, p. 677-88, 2004.

KOJIMA, M.; SUN, L.; HATA, I.; SAKAMOTO, Y.; SASAKI, H.; SASAKI, K. Efficacy of alpha-lipoic acid against diabetic cataract in rat. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 51, n. 1, p. 10-3, 2007.

KOMPELLA, B.U.; BANDI, N.; AYALASOMAYAJULA, S.P. Subconjunctival nano and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 3, p. 1192-1201, 2003.

KONRADE, K.A.; HOFFMAN, A.R.; RAMEY, K.L.; GOLDENBERG, R.B.; LEHENBAUER, T.W. Refractive states of eyes and associations between ametropia and age, breed, and axial globe length in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 2, p. 279-84, 2012.

KURPAKUS-WHEATER, M.; KERNACKI, K.A.; HAZLETT, L.D. Maintaining corneal integrity how the “window” stays clear. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 179-259, 2001.

LE BOURLAIS, C.; ACAR, L.; ZIA, H.; SADO, P.A.; NEEDHAM, T.; LEVERGE, R. Ophthalmic drug delivery systems – Recent advances. **Progress in Retina and Eye Research**, v. 17, n. 1, p. 33-58, 1998.

LEE, A.J.; LEE, J.; SAW, S.M.; GAZZARD, G.; KOH, D.; WIDIAIA, D.; TAN, D.T. Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 86, n. 12, p. 1347-51, 2002.

LEE, V.H.; ROBINSON, J.R. Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 67-108, 1986.

LEITE, A.G.B.; OLIVEIRA, D.; BARALDI-ARTONI, S.M. Morphology of ocular system of domestic animals. **ARS Veterinária**, v. 29, n. 1, p. 42-51, 2013.

LEMP, M.A. Epidemiology and classification of dry eye. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 438, p. 791-803, 1998.

LI, D.Q.; TSENG, S.C. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. **Journal of Cellular Physiology**, v. 163, n. 1, p. 61-79, 1995.

LIN, H.R.; SUNG, K.C.; VONG, W.J. *In situ* gelling of alginate/pluronic solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 6, p. 2358-65, 2004.

LIN, P.Y.; CHENG, C.Y.; HSU, W.M.; TSAI, S.Y.; LIN, M.W.; LIU, J.H.; CHOU, P. Association between symptoms and signs of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the shihpai eye study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 5, p. 1593-8, 2005.

LIU, W.; GRIFFITH, M.; LI, F. Alginate microsphere-collagen composite hydrogel for ocular drug delivery and implantation. **Journal of Material Science**, v. 19, n. 11, p. 3365-71, 2008.

LIU, Y.; PETREACA, M.; YAO, M.; GREEN-MARTINS, M. Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. **BMC Cell Biology**, v. 10, n.1, p. 1-15, 2009.

LU, L.; REINACH, P.S.; KAO, W.W. Corneal epithelial wound healing. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 7, p. 653-64, 2001.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1595-1639, 2005.

LUDWIG, A.; VAN OOTEGHEM, M. The influence of the osmolality on the precorneal retention of ophthalmic solutions. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 42, n. 4, p. 259-66, 1987.

LUZ, A.; URSULIO, M.; CASTANEDA, D.; AMBROSIO-JR, R. Corneal thickness progression from the thinnest point to the limbus: study based on a normal and a keratoconis population to create reference values. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, v. 69, n. 4, p. 579-83, 2006.

MAA, Y.F.; NQUYEN, P.A.; SIT, K.; HSU, C.C. *Spray drying* performance of a bench-top spray dryer for protein aerosol powder preparation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 3, p. 301-9, 1998.

MACRI, F.J.; CEVARIO, S.J. Ciliary ganglion stimulation. II. Neurogenic, intraocular pathway for excitatory effects on aqueous humor production and outflow. **Investigative Ophthalmology**, v. 14, n. 6, p. 471-5, 1975.

MAKHLOF, A.; WERLE, M.; TAKEUCHI, H. Mucoadhesive drug carries and polymers for effective drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 18, n. 6, p. 375-86, 2008.

MALAVAZZI, G.R.; LAKE, J.C.; DANTAS, P.E.C. Effect of honey and autologous serum on corneal epithelial healing in rabbits. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 68, n. 3, p. 347-51, 2005.

MALTESEN, M. J.; BJERREGAARD, S.; HOVGAARD, L.; HAVELUND, S.; WEERT, M. V. Quality by design – *Spray drying* of insulin intended for inhalation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 3, p. 828-38, 2008.

MAO, S.; BAKOWSKY, U.; JINTAPATTANAKIT, A.; KISSEL, T. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivates and insulin. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 95, n. 5, p. 1035-48, 2006.

MARTINEZ, A.J.; MILLS, M.B.; JACELDO, K.B.; TIO, F.O.; AIGBIYBALU, I.B.; HILSENBECK, S.B.; YEE, R.W. Standardization of conjunctival impression cytology. **Cornea**, v. 14, n. 5, p. 512-22, 1995.

MATHERS, W.D.; LANE, J.A.; ZIMMERMAN, M.B. Tear film changes associated with normal aging. **Cornea**, v. 15, n. 3, p. 229-34, 1996.

MAYO, L.; QUAGLIA, F.; BORZACCHIELLO, A.; AMBROSIO, L.; LA ROTONDA, M.I. A novel poloxamers/hyaluronic acid *in situ* forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and *in vitro* release properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 199-206, 2008.

McCULLEY, J.P.; UCHIYAMA, E.; ARONOWICZ, J.D.; BUTOVICH, I.A. Impact of evaporation on aqueous tear loss. **Transaction of the American Ophthalmological Society**, v. 104, p. 121-8, 2006.

McCAA, C.S. The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. **Environmental Health Perspectives**, v. 44, p. 1-8, 1982.

MCLEAN, I.W.; BURNIER, M.N.; ZIMMERMAN, L.E.; JAKOBIEC, F.A. **Tumors of the eye and ocular anexa**. 3 ed., Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology, 1994.

MD Anderson Cancer Center – The University of Texas. “Eye cancer” [online]. Disponível em: <<http://www.mdanderson.org/patient-and-cancer-information/cancer-information/cancer-types/eye-cancer/eye-full.jpg>>. Acesso em 19 de junho de 2014.

MILJANOVIC, B.; DANA, R.; SULLIVAN, D.A.; SCHAUMBERG, D.A. Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of life. **American Journal of Ophthalmology**, v. 143, n. 3, p. 409-15, 2007.

MISHIMA, S. Clinical Investigations on the corneal endothelium. **Ophthalmology**, v. 89, n. 6, p. 525-30, 1982.

MODIS, L.Jr.; LANGENBUCHER, A.; SEITZ, B. Scanning-slit and specular microscopic pachymetry in comparison with ultrasonic determination of corneal thickness. **Cornea**, v. 20, n. 7, p. 711-4, 2001.

MODULO, C.M.; JORGE, A.G.; DIAS, A.C.; BRAZ, A.M.; FILHO, R.B.; JORDÃO-JUNIOR, A.A.; MARCHINI, J.S.; ROCHA, E.M. Influence of insulin treatment on the lacrimal gland and ocular surface of diabetic rats. **Endocrine**, v. 36, n. 1, p. 161-8, 2009.

MOSS, S.E.; KLEIN, R.; KLEIN, B.E. Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome. **Archives Ophthalmology**, v. 118, n. 9, p. 1264-8, 2000.

MOSS, S.E.; KLEIN, R.; KLEIN, B.E. Incidence of dry eye in an older population. **Archives Ophthalmology**, v. 122, n. 3, p. 369-73, 2004.

MUCCIOLI, C.; CAMPOS, M.; GOLDCHMIT, M.; DANTAS, P.E.C.; BECHARA, S.J.; COSTA, V.P. A córnea não é um pedaço de plástico. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 69, n. 5, p. 629-30, 2006.

MYRNA, K.E.; POT, S.A.; MURPHY, C.J. Meet the corneal myofibroblast: the role of myofibroblast transformation in corneal wound healing and pathology. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, Suppl 1, p. 25-7, 2009.

NAGASAKI, T.; ZHAO, J. Centripetal movement of corneal epithelial cells in the normal adult mouse. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 2, p. 558-66, 2003.

NAGAYASU, A.; HIRAYANAGI, T.; TANAKA, Y.; TANGKAWATTANA, P.; UEDA, H.; TAKEHANA, K. Site-dependent differences in collagen lamellae in the corneal substantia propria of beagle dogs. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 71, n. 9, p. 1229-31, 2009.

NAGYOVA, B.; TIFFANY, J.M. Components responsible for the surface tension of human tears. **Current Eye Research**, v. 19, n. 1, p. 4-11, 1999.

NANJAWADE, B.K.; MANVI, F.V.; MANJAPPA, A.S. *In situ*-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. **Journal of Control Release**, v. 122, n. 2, p. 119-34, 2007.

NAVARRO, I.; LEIBUSH, B.; MOON, T.W.; PLISETSKAYA, E.M.; BAÑOS, N.; MÉNDEZ, E.; PLANAS, J.V.; GUTIÉRREZ, J. Insulin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and glucagon: the evolution of their receptors. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 122, n. 1, p. 137-53, 1999.

NELSON, J.D. Impression cytology. **Cornea**, v. 7, n. 1, p. 71-81, 1988.

NELSON, J.D.; HAVENER, V.R.; CAMERON, J.D. Cellulose acetate impressions of the ocular surface. Dry eye states. **Archives of Ophthalmology**, v. 101, n. 12, p. 1869-72, 1983.

NISHIDA, K.; KAWASAKI, S.; KINOSHITA, S. Clusterin may be essential for maintaining ocular surface epithelium as a non-keratinizing epithelium. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 438, p. 629-35, 1998.

NISHIDA, T. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea *in situ*. **The Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 5, p. 1653-7, 1983.

NOITE, M.S.; KARAM, J.H. **Hormônios pancreáticos e fármacos antidiabéticos**. In: KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica e Clínica*, 9 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 991 p. cap. 41, p. 579-597, 2005.

OGURA, Y. Drug delivery to the posterior segment of eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 1, p. 1-3, 2001.

OHASHI, Y.; MOTOKURA, M.; KINOSHITA, Y.; MANO, T.; WATANABE, H.; KINOSHITA, S.; MANABE, R.; OSHIDEN, K.; YANAIHARA, C. Presence of epidermal growth factor in human tears. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 30, n. 8, p.1879-82, 1989.

OLIVEIRA, B.F.; DE SANTANA, M.H.A.; RE, M.I. Spray-dried chitosan microspheres as a pDNA carrier. **Drying Technology**, v. 24, n. 3, p. 373-82, 2006.

OLIVEIRA, I.R.W.Z.; FATIBELLO-FILHO, O.; FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.C. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por *spray drying* e

usadas na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1195-1201, 2009.

OLIVER, C.; WATERS, J.F.; TOLBERT, C.L.; KLEINMAN, H.K. Growth of exocrine acinar cells on a reconstituted basement membrane gel. ***In vitro cellular and developmental biology***, v. 23, n. 7, p. 465-73, 1987.

OLMEZ, G.; CAKMAK, S.S.; SOKER, S.I.; NERGIZ, Y.; YILDIZ, F. Effects of Intravitreal Ropivacaine on Retinal Thickness and Integrity in the Guinea Pig. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, v. 66, n. 4, p. 394-400, 2005.

OWENS, D. R.; GRIMLEY, J.; KIRKPATRICK, P. Inhaled human insulin. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 371-2, 2006.

PARIKH, R.H.; PARIKH, J.R.; DUBEY, R.R.; SONI, H.N.; KAPADIA, K.N. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing 5-fluorouracil: optimization of process parameters. **AAPS PharmaSciTech**, v. 4, n. 2, E13, 2003.

PATEL, D.V.; MCGHEE, C.N. Mapping of the normal human corneal sub-basal nerve plexus by *in vivo* laser scanning confocal microscopy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 12, p. 4485-8, 2005.

PATEL, S.; FARRELL, J.C. Age-related changes in precorneal tear film stability. **Optometry & Vision Science**, v. 66, n. 3, p. 175-8, 1989.

PANETH, N.; QIU, H.; ROSENBAUM, P.; SAIGAL, S.; BISHAI, S.; JETTON, J.; OUDEN, L.D.; BROYLES, S.; TYSON, J.; KUGLER, K. Reliability of classification of cerebral palsy in low-birthweight children in four countries. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 45, n. 9, p. 628-33, 2007.

PEPONIS, V.; BONOVAS, S.; KAPRANOU, A.; PEPONI, E.; FILIOUSSIS, K.; MAGKOU, C.; SITARAS, N. M. Conjunctival and tear film changes after vitamin C and E administration in non-insulin dependent *diabetes mellitus*. **Medical Science Monitor**, v. 10, n. 5, p. 213-7, 2004.

PEPONIS, V.; PAPATHANASIOU, M.; KAPRAOU, A.; MAGKOU, C.; TYLIGADA, A.; MELIDONIS, A.; DROSOS, T.; SITARAS, N.M. Protective role of oral antioxidant supplementation in ocular surface of diabetic patients. The **British Journal of Ophthalmology**, v. 86, n. 12, p. 1369-73, 2002.

PIGATTO, J.A.; CERVA, C.; FREIRE, C.D.; ABIB, F.C.; BELLINI, L.P.; BARROS, P.S.; LAUS, J.S. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 9, p. 427-30, 2008.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; PUGLISI, G. Ocular tolerability of Eudragit RS 100 and RL 100 nanosuspensions as carriers for ophthalmic controlled drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 12, p. 2636-41, 2002.

PILLION, D.J.; BARTLETT, J.D.; MEEZON, E.; YANG, M.; CRAIN, R.J.; GRIZZLE, W.E. Systemic absorption of insulin delivered topically to the rat eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, n. 12, p. 3021-27, 1991.

POLONSKY, K.S. The Past 200 Years in Diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 14, p. 1332-40, 2012.

PRICE, F. W. Jr.; WILLES, L.; PRICE, M.; LYNG, A.; RIES, J. A prospective, randomized comparison of the use *versus* non-use of topical corticosteroids after laser *in situ* keratomileusis. **Ophthalmology**, v. 108, n. 7, p. 1236-44, 2001.

QI, H.; CHEN, W.; HUANG, C.; LI, L.; CHEN, C.; LI, W.; WU, C. Development of poloxamer analogs/carbopol-based *in situ* gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p. 178-87, 2007.

RAMOS-REMUS, C.; SUAREZ-ALMAZOR, M.; RUSSELL, A.S. Low tear production in patients with *diabetes mellitus* is not due to Sjögren's syndrome. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 12, n. 4, p. 375-80, 1994.

RIOS, J.D.; HORIKAWA, Y.; CHEN, L.L.; KUBLIN, C.L.; HODGES, R.R.; DARTT, D.A.; ZOUKHRI, D. Age-dependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervation and secretory response. **Experimental Eye Research**, v. 80, n. 4, p. 477-91, 2005.

ROCHA, E. M.; WICKHAM, L. A.; SILVEIRA, L. A.; KRENZER, K. L.; YU, F-S.; TODA, I.; SULLIVAN, B. D.; SULLIVAN, D. A. Identification of androgen receptor protein and 5 α -reductase mRNA in human ocular tissues. **British Journal Ophthalmology**, v. 84, n. 1, p. 76-84, 2000.

ROCHA, E. M.; CUNHA, D. A.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J. A.; VELLOSO, L. A. Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and

IGF-1 receptor on the human ocular surface. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 43, n. 4, p. 963-967, 2002.

RODRIGUES, G.N.; LAUS, J.L.; SANTOS, J.M.; RIGUEIRO, M.P.; SMITH, R.L. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 2, p. 101-7, 2006.

RODRIGUES, L.B.; LEITE, H.F.; YOSHIDA, M.I.; SALIBA, J.B.; CUNHA, A.S.; FARACO, A.A.G. *In vitro* release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 368, n. 1-2, p. 1-6, 2009.

REKHA, M. R.; SHARMA, C. P. Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption. **Journal of Controlled Release**, v. 135, n. 2, p. 144-51, 2009.

SADRZADEH, N.; MILLER, D. P.; DECHUGA-BALLESTEROS, D.; HARPER, N. J.; STEVENSON, C. L.; BENNETT, D. B. Solid-state stability of *spray-dried* insulin powder for inhalation: chemical kinetics and structural relaxation modeling of Exubera® above and below the glass transition temperature. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 9, p. 3698-3710, 2010.

SADY, C.; KHOSROF, S.; NAGARAJ, R. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 214, n. 3, p. 793-7, 1995.

SAISHIN, Y.; SILVA, L.R.; SAISHIN, Y.; CALLAHAN, K.; SCHOCH, C.; ABLBEIM, M.; LAI, H.; KANE, F.; BRAZZELL, B.K.; BODMER, D.; CAMPOCHIARO, A. P. Periocular injection of microspheres containing PKC412 inhibits choroidal neovascularization in porcine model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 11, p. 4989-4993, 2003.

SAJEESH, S.; SHARMA, C.P. Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, n. 1-2, p. 147-54, 2006a.

SAJEESH, S.; SHARMA, C.P. Interpolymer complex microparticles based on polymethacrylic acid-chitosan for oral insulin delivery. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, n. 2, p. 506-12, 2006b.

SANTOS, J.V.; MOURA, T.F.A.; RAFFIN, F.N. Otimização dos parâmetros de secagem por aspersão de micropartículas de quitosana como carreadores de insulina. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 4, p. 327-33, 2003.

SCHAUMBERG, D.A.; SULLIVAN, D.A. DANA, M.R. Epidemiology of dry eye syndrome. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.506, p. 989-98, 2002.

SCHIPPER, N.G.; OLSSON, S.; HOOGSTRAATE, J.A.; DEBOER, A.G.; VARUM, K.M.; ARTURSSON, P. Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 7, p. 923-9, 1997.

SCHOENWALD, R.D. Ocular drug delivery. Pharmacokinetic consideration. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 18, n. 4, p. 255-69, 1990.

SELIMOT, H.A.; FATIMA, B.; JOSHUA, O.; ABEL, O.; IBRAHIM, H.O. Chemical analysis and characterization of shrimp chitosan in shrimp Shell waste from lagos lagoon, Nigeria. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 11, p. 377-85, 2013.

SHAH, P.P.; MASHRU, R.C.; THAKKAR, A.R.; BADHAN, A.C. Effect of chitosan crosslinking on bitterness of artemether using response surface methodology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 421-7, 2008.

SHANLEY, L. J.; McCAIG, C. D.; FORRESTER, J. V.; ZHAO, M. Insulin, not leptin, promotes *in vitro* cell migration to heal monolayer wounds in human corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, n. 4, p. 1088-94, 2004.

SHULTZ, G.S.; CIPOLLA, L.; WHITEHOUSE, A.; EIFERMAN, R.A.; WOOST, P.G.; JUMBLATT, M.M. Growth factors and corneal endothelial cells: III. Stimulation of adult human corneal endothelial cell mitosis in vitro by defined mitogenic agents. **Cornea**, v. 11, n. 1, p. 20-7, 1992.

SILVA, M.; LIMA, W.G.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 1, p. 46-53, 2011.

SIMAMORA, P.; NADKARNI, S.R.; LEE, Y.C.; YALKOWSKY, S.H. Controlled delivery of pilocarpine 2. *In vivo* evaluation of Gelfoam (R) device. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 170, n. 2, p. 209-214, 1998.

SINDING, C. Making the unit of insulin: standards, clinical work, and industry, 1920-1925. **Bulletin of the History of Medicine**, v. 76, n. 2, p. 231-70, 2002.

SLATTER, D.; DIETRICH, U. Córnea e esclera. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 2007. Cap.91, p.1368-1396.

SMOLIN, G.; THOFT, R.A. **The cornea: scientific foundations and clinical practice**. 2 ed. Boston: Little, Brown and Company, 1987, p. 38-49.

SOCHA, M.; SAPIN, A.; DAMGE, C.; MAINCENT, P. Influence of polymers ratio on insulin-loaded nanoparticles based on poly- ϵ -caprolactone and Eudragit RS for oral administration. **Drug Delivery**, v. 16, n. 8, p. 430-6, 2009.

SO, H.M.; LEE, C.C.H.; LEUNG, A.K.H. Comparing the effectiveness of polyethylene covers (Glad Wrap TM) with lanolin (Duratears) eye ointment to prevent corneal abrasions in critically ill patients: A randomized controlled study. **International Journal Nursing of Studies**, v. 45, p. 1565-71, 2008.

SOLOMON, A.; DURSUN, D.; LIU, Z.; XIE, Y.; MACRI, A.; PFLUGFELDER, S.C. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 10, p. 2283-92, 2001.

SONAJE, K.; LIN, Y-H.; JUANG, J-H.; WEY, S-P.; CHEN, C-T.; SUNG, H-W. In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2329-39, 2009.

SONAJE, K.; LIN, K-J.; WEY, S-P.; LIN, C-K.; YEH, T-H.; NGUYEN, H-N.; HSU, C-W.; YEN, T-C.; JUANG, J-H.; SUNG, H-W. Biodistribution, pharmacodynamics and pharmacokinetics of insulin analogues in a rat model: oral delivery using pH-responsive nanoparticles vc. subcutaneous injection. **Biomaterials**, v. 31, n. 26, p. 6849-58, 2010.

SONIA, T.A.; REKHA, M.R.; SHARMA, C.P. Bioadhesive hydrophobic chitosan microparticles for oral delivery of insulin: *in vitro* characterization and *in vivo* uptake studies. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, n. 5, p. 2902-10, 2011.

STAHL, K.; CLAEISSON, M.; LILLIEHORN, P.; LINDEN, H.; BACKSTROM, K. The effect of process variables on the degradation and physical properties of *spray dried* insulin intended for inhalation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 227-37, 2002.

STEVES, M.J.; DANANBERG, J.; FELDMAN, E.L.; LATTIMER, S.A.; KAMIJO, M.; THOMAS, T.P.; SHINDO, H.; SIMA, A.A.; GREENE, D.A. The linked roles of nitric oxide, aldose, reductase and (Na⁺K⁺)-ATPase in the slowing of nerve conduction in the streptozotocin diabetic rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 2, p. 853-9, 1994.

STRISSEL, K.J.; RINEHART, W.B.; FINI, M.E. Regulation of paracrine cytokine balance controlling collagenase synthesis by corneal cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 2, p. 546-52, 1997.

SULLIVAN, D.A.; HANN, L.E. Hormonal influence on the secretory immune system of the eye: endocrine impact on the lacrimal gland accumulation and secretion of IgA and IgG. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 34, n. 1-6, p. 253-62, 1989.

SULLIVAN, D.A.; KRENZER, K.L.; SULLIVAN, B.D.; TOLLS, D.B.; TODA, I.; DANA, M.R. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 40, n. 6, p. 1261-5, 1999.

SULLIVAN, T.J.; VALENZUELA, A.A. Imaging features of ocular adnexal lymphoproliferative disease. **Eye**, v. 20, n. 10, p. 1189-95, 2006.

TANDON, A.; TOVEY, J. C. K.; SHARMA, A.; GUPTA, R.; MOHAN, R. R. Role of transforming growth factor beta in corneal function, biology and pathology. **Current Molecular Medicine**, v. 10, n. 6, p. 565-578, 2010.

TERVO, T.; VESALUOMA, M.; BENNETT, G.L.; SCHWALL, R.; HELENA, M.; LIANG, Q.; WILSON, S.E. Tear hepatocyte growth factor (HGF) availability increases markedly after excimer laser surface ablation. **Experimental Eye Research**, v. 64, n. 4, p. 501-4, 1997.

TEWA-TAGNE, P.; DEGOBERT, G.; BRIANC, S.; BORGES, C.; GAUVRIT, J. Y.; LANTERI, P.; FESSI, H. *Spray drying* nanocapsules in presence of colloidal silica as drying auxiliary agent: formulation and process variables optimization using experimental designs. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 4, p. 650-661, 2007.

THOFT, R.A.; FRIEND, J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 24, n. 10, p. 1442-3, 1983.

THOMPSON, C.J.; HANSFORD, D.; HIGGINS, S.; ROSTRON, C.; HUTCHEON, G.A.; MUNDAY, D.L. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 53-61, 2007.

TOMLINSON, A.; KHANAL, S.; RAMAESH, K.; DIAPER, C.; MACFADYEN, A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 47, n. 10, p. 4309-15, 2006.

TSENG, S.C.; TSUBOTA, K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. **American Journal of Ophthalmology**, v. 124, n. 6, p. 825-35, 1997.

TSUBOTA, K.; NAKAMORI, K. Effects of ocular surface area and blink rate on tear dynamics. **Archives of Ophthalmology**, v. 113, n. 2, p. 155-8, 1995.

URTTI, A.; SALMINEN, L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. **Survey of Ophthalmology**, v. 37, n. 6, p. 435-56, 1993.

VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Ocular drug delivery: nanomedicine applications. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 11-21, 2007.

VAN HAERINGEN, N.J. Clinical biochemistry of tears. **Survey of Ophthalmology**, v. 26, n. 2, p. 84-96, 1981.

VAREWIJCK, A.J.; JANSSEN, J.A.M.J.L. Insulin and its analogues and their affinities for the IGF1 receptor. **Endocrine-Related Cancer**, v. 19, n. 5, p. F63-75, 2012.

VARSHOSAZ, J.; SADRAI, H.; ALINAGARI, R. Nasal delivery of insulin using chitosan microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 7, p. 761-74, 2004.

Virtual Medical Centre, "**Anatomy of the eye**," 2011. [Online]. Disponível em: <<http://www.virtualmedicalcentre.com/anatomy/the-eye-and-vision/28>>. Acesso em: 20 de junho de 2014.

WAKUTA, M.; MORISHIGE, N.; CHIKAMA, T.; SEKI, K.; NAGANO, T.; NICHIDA, T. Delayed wound closure and phenotypic changes in corneal epithelium of the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rat. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.48, n.2, p. 590-6, 2007.

WALLCOTT, B. The lacrimal gland and its veil of tears. **News in Physiological Science**, v. 13, p. 97-103, 1998.

WATANABE, H. Significance of mucin on the ocular surface. **Cornea**, v. 21, n. 2, Suppl. 1, p. 17-22, 2002.

WATSKY, M.A. Loss of fenamate-activated K^+ current from epithelial cells during corneal wound healing. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 7, p. 1356-63, 1999.

WEI, G.; XU, H.; DING, P.T.; LI, S.M.; ZHANG, J.M. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. **Journal of Controlled Release**, v. 83, n. 1, p. 65-74, 2002.

WEI-LI, C. **Topical autologous insulin application for the treatment of corneal epithelium defect after ocular surgeries.** Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01031888>>. Acesso em: 16 maio 2014.

WHITE, M.F.; KAHN, C.R. The insulin signaling system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 1, p. 1-4, 1994.

WHITTINGHAM, J.L.; ZHANG, Y.; ZAKOVA, L.; DODSON, E.J.; TURKENBURG, J.P.; BRAGE, J.; DODSON, G.G. I222 crystal form of despentapeptide (B26-B30) insulin provides new insights into the properties of monomeric insulin. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 62, n. 5, p. 505-11, 2006.

WILSON, S.E.; HE, Y.G.; WENG, J.; LI, Q.; McDOWALL, A.W.; VITAL, M.; CHWANG, E.L. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. **Experimental Eye Research**, v. 62, n. 4, p. 325-7, 1996.

WILSON, S.E.; LIANG, Q.; KIM, W.J. Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 10, p. 2185-90, 1999.

WILSON, S.E.; MOHAN, R.R.; MOHAN, R.R.; AMBROSIO-JUNIOR, R.; HONG, J.; LEE, J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 20, n. 5, p. 625-37, 2001.

WU, S.; TAO, Y.; ZHANG, H.; SU, Z. Preparation and characterization of water-soluble chitosan microparticles loaded with insulin using the polyelectrolyte complexation method. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

YAMAMOTO, A.; LUO, A.M.; DODDA-KASHI, S.; LEE, V.H. The ocular route for systemic insulin delivery in the albino rabbit. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 249, n. 1, p. 249-55, 1989.

YIN, H.B.; GONG, C.Y.; SHI, S.A.; LIU, X.Y.; WEI, Y.Q.; QIAN, Z.Y. Toxicity evaluation of biodegradable and thermosensitive PEG-PCL-PEG hydrogel as a potential *in situ* sustained ophthalmic drug delivery system. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 92, n. 1, p. 129-37, 2010.

YIN, M.J.; YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R.B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of $\text{I}\kappa\beta$ kinase- β . **Nature**, v. 396, n. 6706, p. 77-80, 1998.

YOON, K.; IM, S.; SEO, M. Changes of the tear film and ocular surface in diabetes mellitus. **Korean Journal of Ophthalmology**, v. 18, n. 2, p. 168-74, 2004.

YOSHIDA, M.; KIMURA, H.; KYUKI, K.; ITO, M. Combined effect of vitamin E and insulin on cataracts of diabetic rats feed a high cholesterol diet. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 3, p. 338-44, 2004.

YU, F-S. X.; YIN, J.; XU, K.; HUANG, J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 2-3, p. 229-235, 2010.

ZAGON, I.S.; KLOCEK, M.S.; SASSANI, J.W.; McLAUGHLIN, P.J. Use of topical insulin to normalize corneal epithelial healing in *diabetes mellitus*. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, n. 8, p. 1082-8, 2007.

ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; McLAUGHLIN, P.J. Insulin treatment ameliorates impaired corneal reepithelialization in diabetic rats. **Diabetes**, v. 55, n. 4, p. 1141-7, 2006.

ZIB, I.; RASKIN, P. Novel insulin analogues and its mitogenic potential. **Diabetics, Obesity & Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 611-20, 2006.

ZOUKHRI, D.; KUBLIN, C.L. Impaired neurotransmitter release from lacrimal and salivary gland nerves of a murine model of Sjogren's syndrome. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 5, p. 925-32, 2001.